

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Katalitičke RNA – molekularni fosili RNA-svijeta

Catalytic RNAs – molecular fossils of the RNA world

Natalia Mrnjavac

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Ita Gruić-Sovulj

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. BIOLOŠKI KATALIZATORI.....	5
2.1. Važnost i uloga u živom svijetu	5
2.2. Op a na ela biološke katalize.....	6
2.3. Strukturna ograni enja za RNA katalizu	7
2.4. Pregled poznatih skupina ribozima.....	8
2.4.1 Mali ribozimi.....	9
2.4.2 Veliki ribozimi	13
2.4.3 Ribonukleoproteinski kompleksi.....	15
3. KAKO RNA KATALIZIRA KEMIJSKE REAKCIJE?.....	21
3.1. Kiselinsko-bazna kataliza	21
3.2. Kataliza metalnim ionima.....	24
3.3. Elektrostatska kataliza	27
3.4. Vezna energija u katalizi	28
3.5. Ostali mehanizmi katalize	29
4. IZREZIVANJE INTRONA IZ PRIMARNIH TRANSKRIPATA	33
4.1. Introni grupe I – po eci istraživanja.....	34
4.2. Introni grupe I – struktura.....	34
4.3. Introni grupe I – odabir mjesta cijepanja.....	38
4.4. Introni grupe I – rezultati kineti kih analiza	40
5. Zaklju ci.....	42
6. Literatura	43
7. Sažetak	45
8. Summary	46

1. UVOD

Pred to no trideset godina, u jednom od laboratorija kemijskog odjela Sveu ilišta Colorado, skupina znanstvenika pod vodstvom Thomasa Cecha je došla do krajnje neo ekivanog otkri a koje e rezultirati revolucijom u dotadašnjim poimanjima biološke katalize, te otvoriti mnoga pitanja za biokemi are i strukturne biologe diljem svijeta, a pružit e i klju ni argument u žustrim raspravama molekularnih evolucionista o porijeklu života na Zemlji (Kruger i sur. 1982; Cech 2002). Otkri e kataliti kih RNA objavljeno je 1982. godine u asopisu *Cell* (Kruger i sur. 1982). Znanstvenici su istraživali izrezivanje introna i ligaciju eksona pre-rRNA kod jedne vrste trepetljikaša, *Tetrahymena termophila* (Kruger i sur. 1982). S obzirom da su do tada poznati katalizatori u biološkim sustavima bili isklju ivo proteinske prirode (Lilley 2003), znanstvenici su dugo pokušavali izolirati protein koji bi katalizirao spomenute reakcije (Cech 2002). No, uspjeli su izolirati aktivni oblik pre-rRNA kod kojeg su se spomenute reakcije odvijale bez dodatka proteina. Štoviše, nakon ekstrakcije SDS-fenolom, zagrijavanja u prisustvu SDS-a, te tretmana proteazama, aktivnost je bila o uvana. Hipoteza da RNA sama katalizira izrezivanje svojih introna je bila sve izglednija. Ona je i dokazana pomo u *in vitro* transkribiranih pre-rRNA s plazmida u kontroliranim uvjetima; izrezivanje i ligacija transkripata se doga ala bez dodatka proteina (Kruger i sur. 1982). Ipak, ova se molekula nije smatrala pravim enzimom zato što nema obrtaj, odnosno ne može katalizirati eksciziju i ligaciju na drugim molekulama pre-rRNA kada se jednom intron izreže (Kruger i sur. 1982). Idu e godine je suradnja izme u laboratorija Altmana i Pacea rezultirala otkri em da je RNaza P koja procesira 5' krajeve tRNA u svim organizmima također ribozim (Cech 2002). RNaza P je bila prvi otkriveni ribozim sa sposobnoš u višestrukog obrta, poput proteinskih enzima (Narlikar i Herschlag 1997; Doudna i Cech 2002). 1989. godine su Sidney Altman i Thomas R. Cech dobili Nobelovu nagradu za kemiju za otkri e kataliti kih svojstava RNA (www.nobelprize.org).

Otkri e RNA katalizatora ili ribozima (Kruger i sur. 1982) je stalo na kraj raspravama o tome je li prvo bila „kokoš ili jaje“, odnosno geneti ka informacija ili kataliti ka molekula (poznato pod nazivom „Orgelov paradoks“). Danas vlada konsenzus da su DNA genomima prethodili RNA genomi (što potvr uje i sama kemija tih molekula) (Forterre 2005), i da je u to doba RNA bila i informacijska i kataliti ka molekula (Doudna i Cech 2002; Lilley 2003; Doudna i Lorsch 2005). Molekula RNA je u po etku trebala biti sposobna katalizirati mnogo širi spektar reakcija nego što to ini danas, a *in vitro* selekcijom je dokazano da ona ima sve

preduvjete za to i da se, uz odgovarajuće selekcijske uvjete, mogu dobiti molekule RNA koje kataliziraju reakcije poput polimerizacija ovisnih o kalupu, aminoacilacija, alkilacija, stvaranja amidne veze, glikozidne veze, redoks reakcija i dr. (Fedor 1998; Lilley 2003; Alberts i sur. 2008). *In vitro* je dokazano i da katalitička RNA iz *Tetrahymena thermophila* može mjesno-specifično cijepiti DNA supstrat (Herschlag i Cech 1990a). Ovo je otkriće sugeriralo da su RNA katalizatori mogli djelovati na DNA prije nastanka mašinerije za sintezu proteina. Brzina reakcije se smanjila samo 10 puta u odnosu na RNA supstrat zato što je korak koji ograničava brzinu reakcije za RNA supstrat vezanje supstrata u aktivno mjesto, a za DNA supstrat ograničavajući korak postaje sam kemijski korak (Herschlag i Cech 1990a).

RNA-svijet je pojam kojeg je uveo Gilbert kako bi opisao svijet slobodnih molekula RNA u međusobnoj kompeticiji pred oko 3,6 milijardi godina (Lilley 2003; Forterre 2005). No, malo je vjerojatno da bi se rani metabolizam mogao razviti i evoluirati bez postojanja neke vrste pristanica odijeljenih od okoliša. Stoga danas sve više znanstvenika opisuje RNA-svijet kao svijet stanica s RNA genomima (Forterre 2005). U tom svijetu se s vremenom povećavala potreba za vjernošću u prijenosu genetičke informacije, te za stabilnošću u genomu, a sve je manja bila korist od visoke stope mutacija, te DNA stanice počinju prevladavati, a na kraju i odnose pobjedu u borbi za opstanak (Forterre 2005). Evolucija metabolizma je, s druge strane, postavljala sve veće katalitičke zahtjeve (potreba za većom vjernošću, procesivnošću, brzinom, raznolikošću u katalizatoru) što je potaklo postupni prijelaz na proteinsku katalizu (Doudna i Lorsch 2005; Strobel i Cochrane 2007). Prema takvom shvaćanju ranog života na Zemlji današnji ribozimi predstavljaju ostatke tog za molekulu RNA zlatnog doba, žive fosile RNA-svijeta (Lilley 2003). Nemoguće je reći i zašto se RNA kataliza održala do danas, i to u vrlo uskom spektru reakcija (ribozimi imaju isključivo fosforil-transferaznu i peptidil-transferaznu aktivnost) (DeRose 2002). No, očit je činjenica da su se za većinu metaboličkih reakcija proteinski katalizatori pokazali efikasnijima, te stoga i evolucijski uspješnijima.

Cilj ovoga rada je prikazati specifičnosti RNA kao katalitičkih molekula, usporediti na njih katalize enzima i ribozima, te dati prikaz glavnih skupina do danas otkrivenih ribozima i njihovih katalitičkih mehanizama, uz poseban osvrt na neke strukturne i kinetičke značajke introna grupe I, u koje se ubraja i prvi otkriveni RNA katalizator iz vrste *Tetrahymena thermophila*.

2. BIOLOŠKI KATALIZATORI

Pojam biokatalizatora uključuje sve molekule koje kataliziraju (ubrzavaju) biološki važne reakcije u stanicama i tkivima. Biološka kataliza je prvi put primijećena i opisana u 18. st. na fenomenu probave mesa u želucu (Nelson i Cox 2008). Krajem 19. st. je Eduard Buchner otkrio molekule koje potiču alkoholno vrenje u kvascu. One su kasnije nazvane enzimima (Nelson i Cox 2008). 1926. godine je James Sumner uvidio da se kristali ureaze sastoje isključivo od proteina, što ga je naglalo da zaključi kako su svi enzimi proteini (Nelson i Cox 2008). U nedostatku suprotnih dokaza, ta se teza nije osporavala mnogo desetljeća. Otkriće katalitičkih RNA je opovrgnulo Sumnerov postulat, otvorilo vrata novom području RNA enzimologije i uvrstilo jednu novu, potpuno drukčiju molekulu u skupinu biokatalizatora.

2.1. Važnost i uloga u živom svijetu

Biološki katalizatori, primarno enzimi, se razlikuju od anorganskih kemijskih katalizatora po nekoliko bitnih značajki. Za početak, stopa ubrzanja kemijske reakcije je za nekoliko redova veličine viša u odnosu na anorganske katalizatore, tako da je u prisutnosti enzima reakcija ubrzana za faktor 10^6 - 10^{12} u odnosu na nekataliziranu reakciju u otopini. Neki ribozimi, među kojima RNaza P i pre-rRNA iz *Tetrahymena*, također ubrzavaju reakcije do ogromnih razmjera (10^{11} puta u odnosu na nekataliziranu reakciju) (Narlikar i Herschlag 1997). Drugo, biološki katalizatori moraju djelovati u blagim uvjetima koji pogoduju odvijanju života, dakle u fiziološkom rasponu pH, pod atmosferskim tlakom i temperaturama nižim od 100 °C. Treće, biološki katalizatori imaju puno veće specifičnosti za supstrate i produkte od anorganskih katalizatora. Četvrto, aktivnost mnogih bioloških katalizatora, a ovdje se misli na enzime, može se kontrolirati alosterijom, kovalentnom modifikacijom i sl. (Voet i Voet 2011). Navedena svojstva su rezultat nekoliko milijardi godina evolucije katalize u živim sustavima koja je omogućila optimizaciju katalitičkih funkcija za uvjete koji vladaju u stanicama.

Zašto su biološki katalizatori toliko važni? Odgovor je jednostavan – zato što bez njih ne bi bilo života. Biološke molekule su u pravilu stabilne pri blagim uvjetima stanice (Nelson i Cox 2008). To znači da reagiraju vrlo sporo, unatoč tome što razlika standardne Gibbsove slobodne energije supstrata i produkata (ΔG°) za mnoge reakcije ide u prilog nastajanja produkta (termodinamski povoljne reakcije). Razlog je visoka energija aktivacije reakcija, odnosno energija potrebna za usmjeravanje kemijskih skupina koje ulaze u reakciju, nastanak

kratkotrajnog naboja, reorganizaciju kemijskih veza i drugih promjena koje vode od supstrata do prijelaznog stanja (Nelson i Cox 2008). Funkcija katalizatora je ubrzavanje kemijskih reakcija snižavanjem energije aktivacije. Da bi to bilo moguće reakcija mora biti termodinamski povoljna jer katalizatori ne utječu na kemijsku ravnotežu.

S obzirom da se sva svojstva koja biolozi navode kao osnovne značajke živoga (metabolizam, razmnožavanje, podražljivost, rast, homeostaza, ...) na molekularnoj razini temelje na kemijskim reakcijama koje ne mogu napredovati bez katalizatora, jasno je da su te molekule jedan od osnovnih preduvjeta za život.

2.2. Osnovna načela biološke katalize

Osnovni cilj katalize je stabilizirati prijelazno stanje u odnosu na osnovno stanje ili destabilizirati kompleks enzim-supstrat (Doudna i Lorsch 2005). Oba ova načina rezultiraju smanjenjem energije aktivacije, odnosno energetskog raskoraka između osnovnog i prijelaznog stanja. Bez obzira na to je li biokatalizator u pitanju protein ili RNA, ograničen je broj mehanizama kojima se to može postići. Opisani su ukratko mehanizmi koji su otkriveni i proučavani na enzimima, a u nastavku teksta će biti objašnjeno koje od tih mehanizama molekula RNA koristi u katalizi, zašto i na koji način.

Kiselinsko-bazna kataliza je mehanizam koji omogućava stvaranje boljeg nukleofila otpuštanjem protona kojeg prima opća baza, odnosno stabilizaciju izlazne skupine i prijelaznog stanja protonacijom supstrata od strane opće kiseline. Kod enzima skupine s kiselinsko-baznim svojstvima mogu stvoriti put za kretanje protona u i iz aktivnog mjesta (Doudna i Lorsch 2005).

Kataliza metalnim ionima uključuje metalne kofaktore. Oni pomažu u orijentaciji supstrata i stabilizaciji naboja u prijelaznom stanju, a sudjeluju i u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama (Nelson i Cox 2008).

Kod kovalentne katalize dolazi do stvaranja kovalentne veze između katalizatora i supstrata. Ako je takva promjena puta reakcije energetski opravdana, odnosno ako rezultira smanjenjem energije aktivacije reakcije, dolazi do katalize (Narlikar i Herschlag 1997; Nelson i Cox 2005).

O elektrostatskoj katalizi se govori kada su naboji oko aktivnog mjesta raspoređeni na način da stabiliziraju prijelazno stanje i/ili pozicioniraju supstrat(e) (Voet i Voet 2011). Za ovakvu katalizu je bitna sposobnost katalizatora da kontrolira mikrookolinu aktivnog mjesta

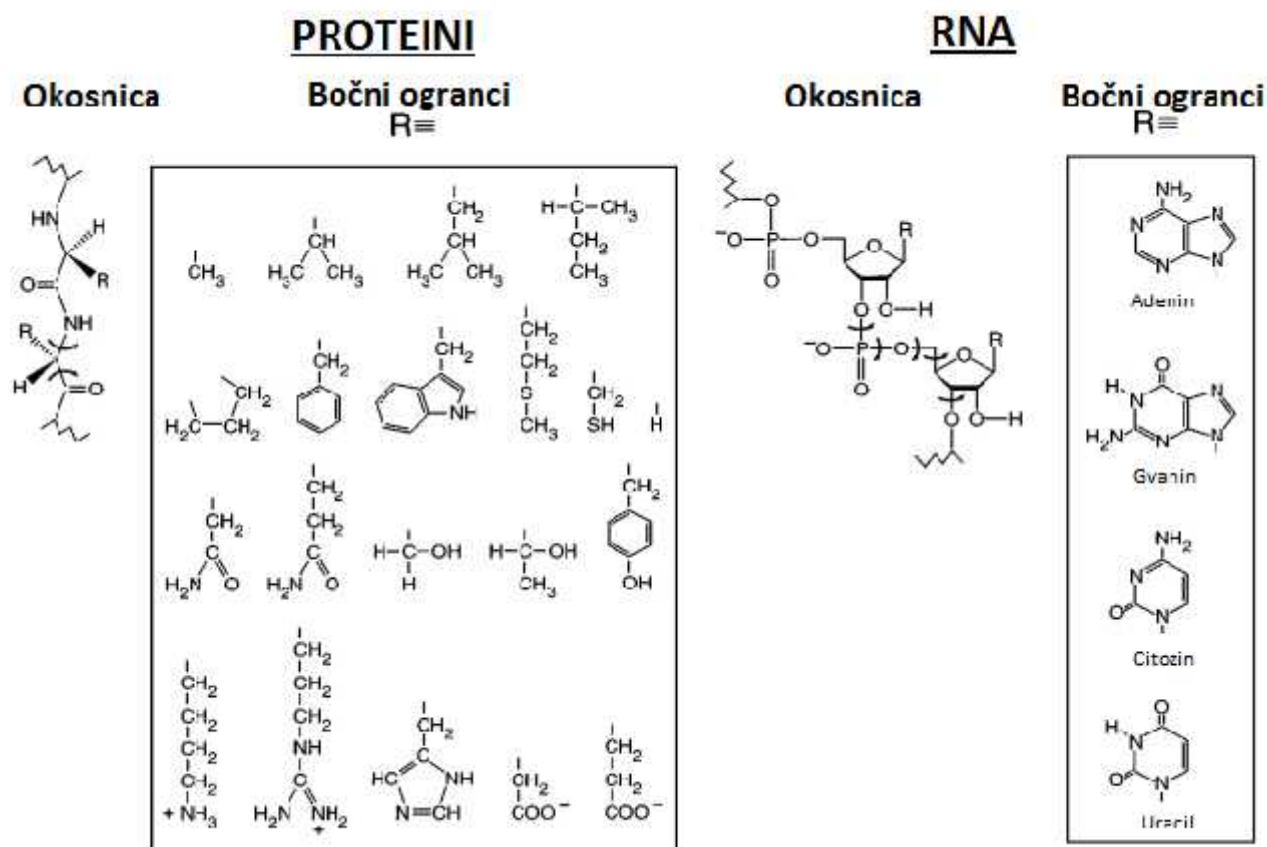
kako bi stvorio uvjete niže dielektrične konstante od vode, što pojačati efekt elektrostatskih interakcija (Narlikar i Herschlag 1997).

Još jedna bitna sastavnica biološke katalize je približavanje i pravilna orijentacija supstrata u aktivnom mjestu (Voet i Voet 2011). Da bi se to ostvarilo nastaje mnoštvo nekovalentnih interakcija između supstrata i katalizatora. Ipak, važno je da se optimalne interakcije između katalizatora i supstrata stvaraju u prijelaznom stanju, a ne u osnovnom. To znači da dobar katalizator nije savršeno komplementaran supstratu (prema Fischerovom modelu ključ-brava iz 1894. god.), već u prijelaznom stanju (prema novom modelu Planyija, Haldanea i Paulinga) (Nelson i Cox 2008). Slobodna energija potrebna za dostizanje prijelaznog stanja se djelomično namiruje kada se u prijelaznom stanju stvore nove energetske povoljne interakcije koje nisu postojale u osnovnom stanju, a neke nepovoljne interakcije se prekidaju (takve interakcije mogu biti i udaljene od aktivnog mjesta). Ovakvo smanjenje energetskog raskoraka između osnovnog i prijelaznog stanja definiramo kao upotrebu vezne energije u katalizi (Nelson i Cox 2008).

2.3. Strukturna ograničenja za RNA katalizu

Otkriće katalitičkih molekula RNA je bilo posebno iznenađujuće zato što se nukleinske kiseline kemijski vrlo razlikuju od proteina, pa se činilo da molekuli RNA nedostaje većina svojstava koja od enzima čine dobre katalizatore. Za početak, molekula RNA nema funkcionalne skupine analogne onima koje najčešće imaju katalitičku ulogu kod enzima: imidazol histidina, karboksilat aspartata i glutamata, alkilamin lizina, te sulfhidril cisteina (Narlikar i Herschlag 1997; Fedor 1998). Umjesto toga RNA ima četiri slične heterociklične baze (Slika 1.). K tome, dok su kod enzima funkcionalne skupine aminokiselina orijentirane prema van, strše i izmuknute, kod RNA su nukleobaze orijentirane prema unutrašnjosti RNA dupleksa, dok su monosaharidi i fosfati okrenuti prema vanjskoj strani (Doherty i Doudna 2001; Cech 2002). To otežava stvaranje tercijarnih interakcija koje su važne za formiranje stabilnih struktura i dovoljno rigidnih aktivnih mjesta za pozicioniranje supstrata (Narlikar i Herschlag 1997). Tercijarne interakcije su dodatno destabilizirane zbog visoke gustoće negativnog naboja na fosfatima molekule RNA, te velike fleksibilnosti okosnice - dok kod proteina samo 2 veze u okosnici mogu slobodno rotirati, kod RNA čak 5 veza slobodno rotira (Narlikar i Herschlag 1997) (Slika 1.). Uza sve te strukturne nedostatke molekule RNA koji ju na prvi pogled čine potpuno nepodobnom za katalizu, ona

se ipak do danas održala kao katalizator nekoliko biološki vrlo važnih reakcija, a sve upu uje na to da je nekada bila glavni katalizator ranog metabolizma.



Slika 1. Usporedba slobodno rotiraju ih veza okosnice i raznolikosti bo njih ogranaka kod proteina i RNA.

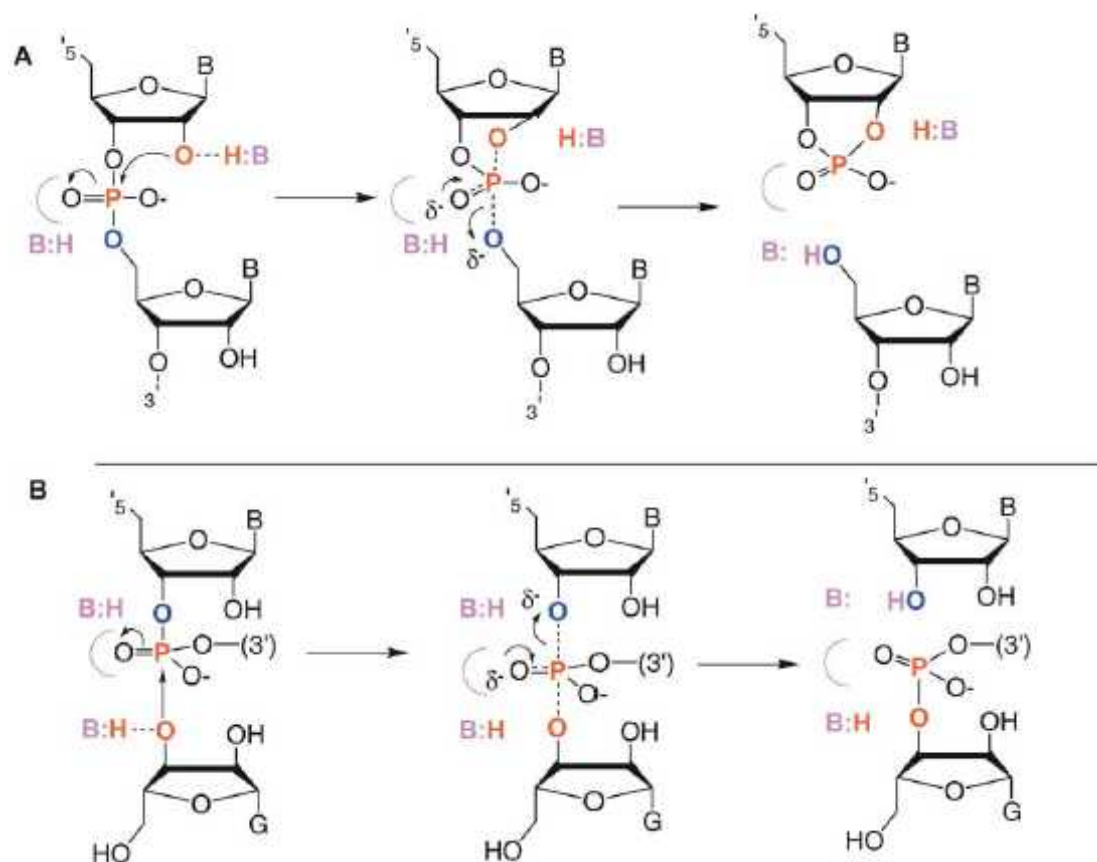
(Preuzeto iz Narlikar i Herschlag 1997)

2.4. Pregled poznatih skupina ribozima

Autokataliti ki ribozimi kataliziraju cijepanje vlastite molekule RNA, a mogu se svrstati u dvije skupine. U reakcijama kataliziranim malim ribozimima 2'-OH nukleofilna skupina napada vlastiti 3' fosfodiester (Lilley 2003) (Slika 2.A). U ovu skupinu spadaju *hammerhead*, *hairpin* i HDV (DeRose 2002; Doudna i Lorsch 2005). Veliki ribozimi, s druge strane, kataliziraju reakcije u kojima 2'-OH skupina vanjskog nukleotida ili nukleotida s udaljenog dijela RNA lanca ima ulogu nukleofila (Slika 2.B). U ovu skupinu spadaju introni grupe I i II (DeRose 2002, Lilley 2003).

Osim navedenih, u kataliti ke RNA se ubrajaju i neki ribonukleoproteinski kompleksi kao što su RNaza P, ribosom i *spliceosome*. Reakcija katalizirana RNA podjedinicom RNaze P je sli na reakciji malih ribozima (DeRose 2002), a *spliceosome* djeluje sli no intronima

grupe II (Doudna i Cech 2002). Ribosom ima specifičan mehanizam s obzirom da katalizira reakciju prijenosa peptidila.



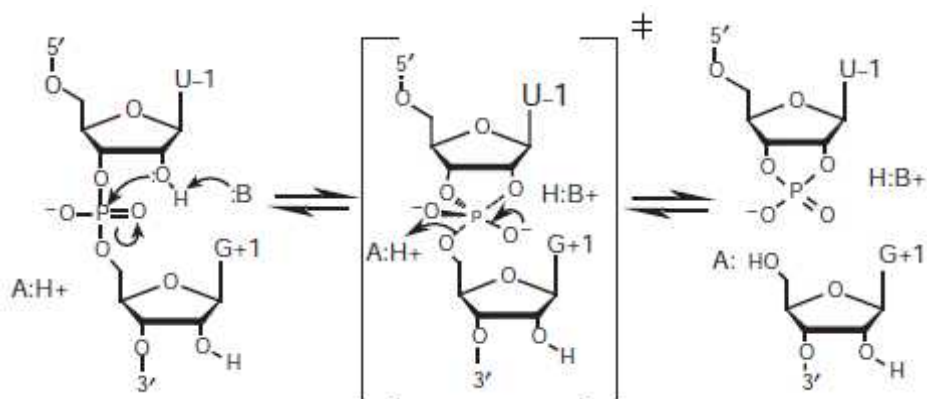
Slika 2. Mehanizam katalize reakcije prijenosa fosforila kod malih ribozima (A) i velikih ribozima (B).

B označava skupinu koja sudjeluje u kiselinobaznoj katalizi, a lukovi upućuju na mjesta stabilizacije negativnog naboja.

(Preuzeto iz DeRose 2002)

2.4.1 Mali ribozimi

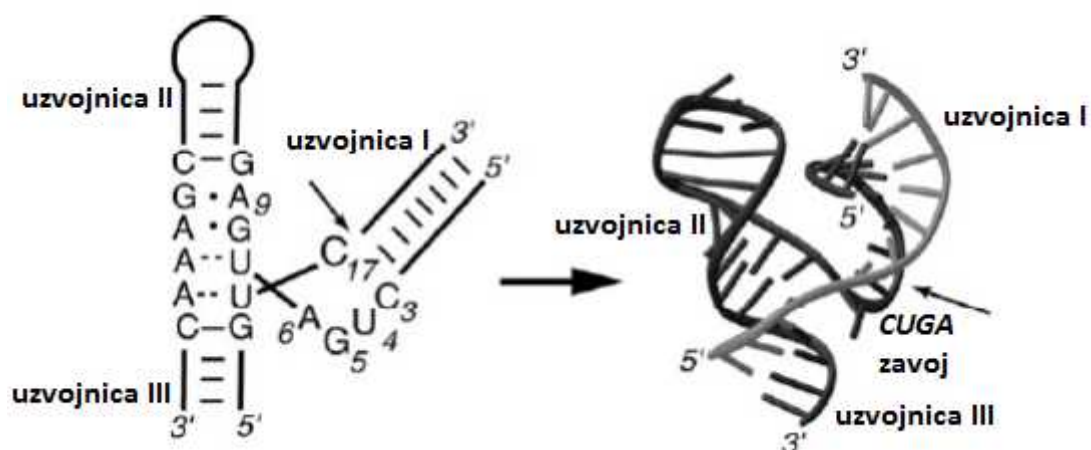
U slučaju malih ribozima cijepanje je mjesno-specifično zahvaljujući Watson-Crickovim i drugim interakcijama koje se stvaraju između aktivnog mjesta i supstrata (Doudna i Lorsch 2005). Reakcija rezultira stvaranjem 2',3'-cikličkog fosfata i slobodne 5'-OH skupine, te inverzijom konfiguracije na fosfatu (S_N2 reakcija) (Lilley 2003) (Slika 3.). Radi se o kratkim molekulama RNA duljine 50-150 nukleotida, a moguće ih je naći u genomima virusa, virusoida i satelitnih RNA (Doherty i Doudna 2001). Funkcija im je cijepanje produkta koji nastaje replikacijom kotrljajućeg kruga u genome odgovarajuće duljine (Doherty i Doudna 2001).



Slika 3. Op i mehanizam malih samoizrezuju ih ribozima. Op a baza (:B) aktivira 2'-OH za nukleofilni napad na susjedni fosfat oduzimanjem protona. Op a kiselina (A:H) stabilizira negativni naboj na kisiku izlazne skupine donacijom protona.

(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

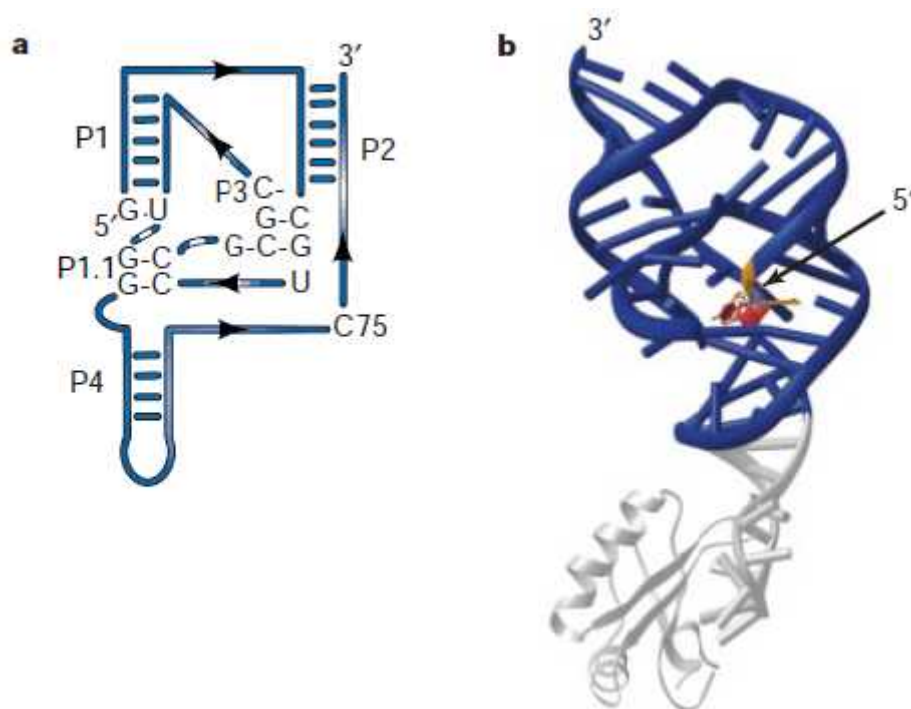
Hammerhead ribozim je bio prvi kristalizirani ribozim, a činjenica da su njegovi RNA lanci uspješno razdvojeni na katalizator i supstrat je omogućila podrobnija istraživanja (DeRose 2002; Doudna i Lorsch 2005). Najmanja funkcionalna regija *hammerhead* ribozima se sastoji od tri uzvojnice (I, II i III) između kojih se nalaze određeni vezni nukleotidni slijed (Doherty i Doudna 2001; DeRose 2002) (Slika 4.). Dodatni određeni slijedovi služe za stabilizaciju aktivne konformacije kod prirodnog *hammerhead* ribozima (Doudna i Lorsch 2005). Konformacijska promjena koja se sastoji od distorzije okosnice između uzvojnica II i III potiče pozicioniranje nukleotida C17 u aktivno mjesto na dodiru triju uzvojnica; 3' od C17 se nalazi veza koja podliježe cijepanju (Doherty i Doudna 2001; DeRose 2002) (Slika 4.). Struktura aktivnog mjesta omogućava pristup otapala (Doherty i Doudna 2001). Još 1997. god. su Narlikar i Herschlag pisali o upotrebi vezne energije u katalizi *hammerhead* ribozima, a noviji podaci ukazuju i na mogućnost katalize nukleobazama: naime, dva kritična G su locirana u aktivnom mjestu (Strobel i Cochrane 2007). Osim toga, za aktivnost *hammerhead* ribozima su potrebni dvovalentni metalni ioni, a u njihovom odsustvu aktivnost se zadržava uz dodatak visoke koncentracije monovalentnih iona (DeRose 2002). Od samog otkrića ove katalitičke molekule RNA traju debate vezane uz ulogu metalnih iona u mehanizmu reakcije. Teško je objasniti i povezati podatke dobivene iz različitih kristalnih struktura s informacijama dobivenim pomoću supstitucija određenih atoma, NMR-om i kinetičkim istraživanjima. Dok stariji izvori navode katalitičku ulogu metala u mehanizmu (Narlikar i Herschlag 1997), noviji radovi spominju i mogućnost strukturne uloge kationa (Doudna i Lorsch 2005). O ovoj problematici će biti više riječi u poglavlju 3.2.



Slika 4. Sekundarna i terciјarna struktura *hammerhead* ribozima. Baze označene slovima su univerzalno očuvane. Točke i crtice među bazama označavaju ne-Watson-Crickova sparivanja. Strjelicom je označeno mjesto cijepanja.

(Preuzeto iz Doherty i Doudna 2001)

Hepatitis delta virus (HDV) se nalazi u genomu satelitne RNA koja pojačava efekt virusa hepatitisa B (DeRose 2002). Ubrzava reakciju 100 puta više od *hammerhead* ribozima (10^8 u odnosu na nekataliziranu reakciju) (Doherty i Doudna 2001; Doudna i Lorsch 2005), približavajući se vrijednosti proteinskih enzima. Neobičan je po tome što je izrazito stabilan, s optimalnom temperaturom za katalizu oko 65 °C, a zadržava aktivnost i pri 80 °C u puferu s 5 M ureom (Doherty i Doudna 2001). Regija supstrata 5' od veze koja se cijepa nije sparena s ribozimom, osim prvog nukleotida uzvodno od mjesta cijepanja koji je stoga jedini relevantan za reakciju. HDV duguje stabilnost kompaktnoj strukturi građenoj od dvostrukog pseudo vira kojeg čine pet uzvojnica (P1, P1.1, P2, P3 i P4) koje interagiraju na različite načine (Doherty i Doudna 2001) (Slika 5.). Za razliku od *hammerhead* ribozima, aktivno mjesto je duboko ukopano u strukturu i zaštićeno od utjecaja otapala, što dodatno pospješuje katalitičku djelotvornost (Doherty i Doudna 2001). Na ovom ribozimu je prvo predložena mogućnost upotrebe kiselinsko-bazne katalize od strane RNA katalizatora (Doudna i Lorsch 2005). Kritičan je nukleotid C75, čija se uloga biti detaljnije objašnjena u idućem poglavlju (3.1.). Osim toga, prisutnost dvovalentnih metalnih iona je potrebna za reakciju, iako u nižim koncentracijama nego kod drugih malih ribozima koji kataliziraju istu reakciju (Doherty i Doudna 2001; DeRose 2002). Uloga nije razjašnjena, ali je moguće da metalni hidroksid služi kao drugi element u kiselinsko-baznoj katalizi (ako je C75 baza, on djeluje kao opća kiselina, i obrnuto) (DeRose 2002).

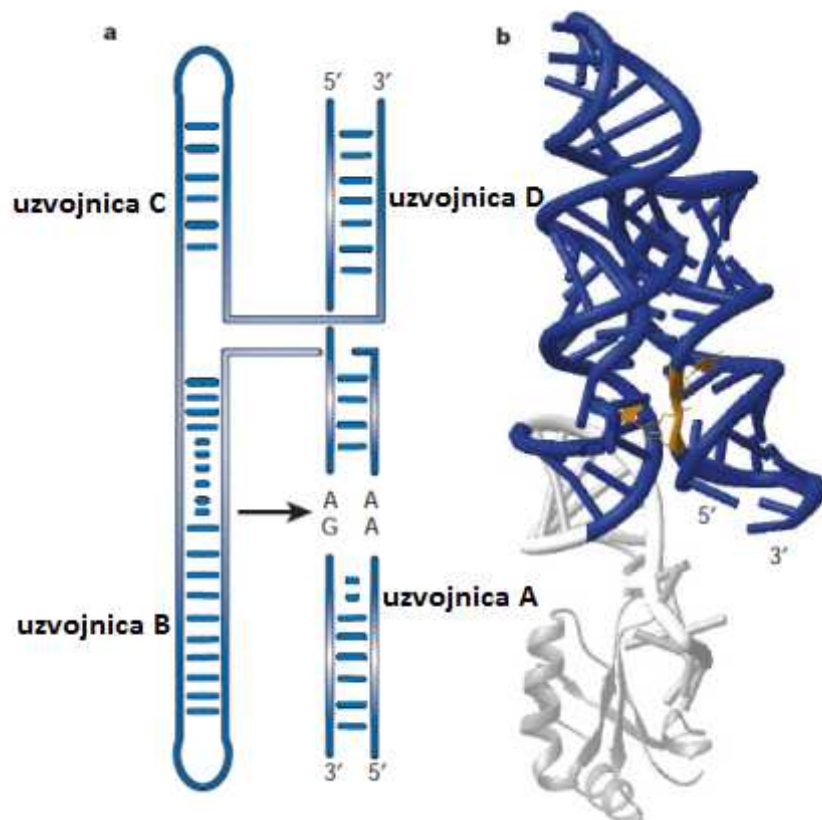


Slika 5. a) Sekundarna struktura HDV-a koju čine pet uzvojnica (P1, P1.1, P2, P3 i P4). Nukleotid C75 je bitan za katalizu. Veza koja se cijepa se nalazi kraj oznake za 5' kraj lanca. b) Tercijarna struktura HDV-a. C75 je označen crveno, a 5' nukleotid koji jedini stvara interakciju s katalitičkim dijelom molekule je označen zlatnim.

Strjelica označava mjesto cijepanja.

(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

Hairpin ribozim tvore četiri uzvojnice koje povezuje središnje spojno mjesto. U dvjema susjednim uzvojnica se nalazi po jedan mjehur nesparenih baza. Reakcija se događa između nukleotida u mjehuru uzvojnice A (Slika 6.). Baza G+1 koja se nalazi tik uz vezu koja se cijepa u uzvojnici A se u tercijarnoj strukturi sparuje s bazom C25 koja se nalazi u mjehuru nesparenih baza uzvojnice B. Takva konformacija potiče pravilno pozicioniranje nukleofila (Lilley 2003). Osim toga, neki rezultati upućuju na moguću ulogu baze G8 u kiselinsko-baznoj katalizi (DeRose 2002; Lilley 2003). U prisustvu Mg^{2+} iona ribozim stvara funkcionalno aktivno mjesto (Lilley 2003). Unatoč tome, činjenica da divalentni kationi nisu potrebni tijekom reakcije cijepanja upućuje na mehanizam neovisan o metalnim ionima (Doudna i Cech 2002).



Slika 6. a) Sekundarna struktura *hairpin* ribozima. Otvane baze su označene slovima, a nekanonski bazni parovi crnim linijama. Regije kod kojih nije moguće Watson-Crickovo sparivanje baza tvore mjehure u A i B uzvojnica. Strjelica označava mjesto cijepanja. b) Tercijarna struktura *hairpin* ribozima. Nukleotidi koji okružuju vezu koja podliježe cijepanju su obojani zlatno.

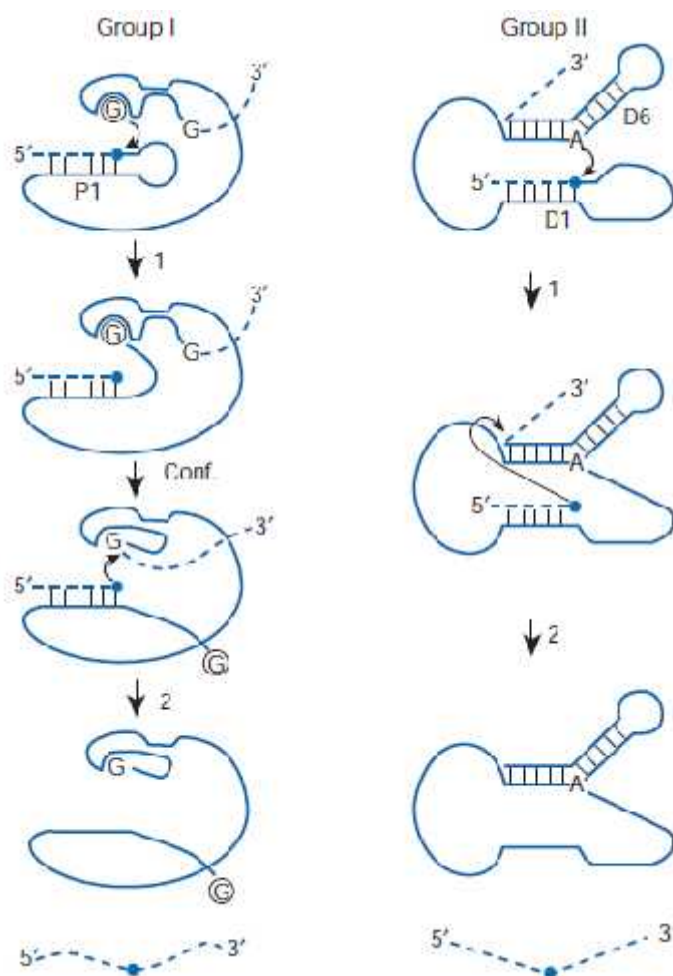
(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

2.4.2 Veliki ribozimi

Nalaze se u jezgri, mitohondrijima i kloroplastima različitih eukariota (ali ne kralješnjaka), te nekih bakterija i faga (Doudna i Cech 2002; Voet i Voet 2011). Kataliziraju vlastitu eksciziju i ligaciju eksona, a aktivno mjesto se nalazi na intronu. Nukleotidni slijed introna je kritičan za katalizu jer omogućava sklapanje specifične trodimenzionalne strukture introna koja se približiti 5' i 3' mjesta cijepanja i pozicionirati reaktivne i katalitičke važne skupine (Alberts i sur. 2008). Za razliku od malih ribozima, kod ove skupine se različiti supstrati koriste za svaki reakcijski korak, stoga katalitičko središte ovih RNA katalizatora mora biti dovoljno fleksibilno da otpusti jedan, te pozicionira i veže visokim afinitetom novi supstrat. U tome pomažu periferni ogranci prisutni kod ove skupine katalizatora (Doherty i Doudna 2001). Podijeljeni su u dvije grupe prema prirodi nukleofila.

Kod introna grupe I vanjski gvanin nukleozid ili nukleotid kofaktor vezan na G-veznom mjestu introna kreće u nukleofilni napad svojom 3'-OH skupinom. Dolazi do cijepanja fosfodieterske veze, a vanjski G ostaje vezan za 5' kraj introna (Doudna i Cech 2002; Nelson i Cox 2008). Prije drugog koraka dolazi do konformacijske promjene zahvaljujući kojoj obojani G na 3' kraju introna zamjenjuje vanjski G u G-veznom mjestu. Slobodni -OH 5' eksona nukleofilno napada 3' kraj introna u drugom koraku reakcije, te dolazi do izrezivanja introna i spajanja eksona (Doudna i Cech 2002) (Slika 7. lijevo). Neke značajke ovih introna će biti detaljno obrađene u 4. poglavlju.

Kod introna grupe II ulogu nukleofila ima adenzin unutar primarnog nukleotidnog slijeda introna. 2'-OH adenozina iz domene D6 nukleofilno napada spoj 5' eksona i introna koji je pozicioniran zahvaljujući interakcijama s domenom D1 introna; rezultat je razgranati intermedijer koji osim tipične 3',5' fosfodieterske veze sadrži i novostvorenu neobičnu 2',5' fosfodietersku vezu (Doudna i Cech 2002). Drugi korak je jednak kao u intronima grupe I. Izrezani intron ima cirkulariziranu regiju zahvaljujući rasporedu veza na nukleofilnom adeninu (Slika 7. desno).



Slika 7. Mehanizam samoizrezivanja introna grupe I (lijevo) i II (desno).

(Preuzeto iz Doudna i Cech 2002)

2.4.3 Ribonukleoproteinski kompleksi

Spliceosome ima vrlo sličan mehanizam reakcije intronima grupe II, pa se smatra da je i evoluirao iz ove skupine samoizrezujućih introna (Alberts i sur. 2008). Danas većina introna nije samoizrezujuća, uključujući i introne svih jezgrinih pre-mRNA. *Spliceosome* tvore snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) koji se sastoje od proteina i snRNA (*small nuclear RNAs*) – U1, U2, U4, U5 i U6 (Nelson i Cox 2008). Dio nukleotidnog slijeda U1 snRNA je komplementaran 5' mjestu cijepanja, pa se U1 snRNP veže na to mjesto i označava ga za cijepanje (Slika 8.). Adenozin u unutrašnjosti introna koji ima ulogu nukleofila u reakciji (kao u intronima grupe II) je prvo prepoznat od strane dva proteina (BBP i U2AF), koji su potom zamijenjeni s U2 snRNP; on aktivira nukleofil (Alberts i sur. 2008; Nelson i Cox 2008). Kompleks s vezanim svim snRNP-ovima je inaktivan. Tek izbacivanjem U1 i U4 je omogućeno vezanje U6 za 5' mjesto cijepanja i za U2, što dovodi do približavanja nukleofila

mjestu napada (Nelson i Cox 2008) (Slika 8.). U6 i U2 snRNA tvore trodimenzionalnu strukturu koja sudjeluje u katalizi prve transesterifikacijske reakcije. U ligaciji eksona sudjeluje U5 snRNA (Alberts i sur. 2008). Za izrezivanje introna *spliceosomom* su potrebni rearanžmani unutar kompleksa, konformacijske promjene, te kidanje i stvaranje interakcija tijekom reakcije. Treba uoči i potrebu za proteinima za prepoznavanje unutarnjeg A nukleofila, iako oni imaju sporednu ulogu. ATP je potreban za slaganje kompleksa, ali ne i za reakciju (Nelson i Cox 2008).

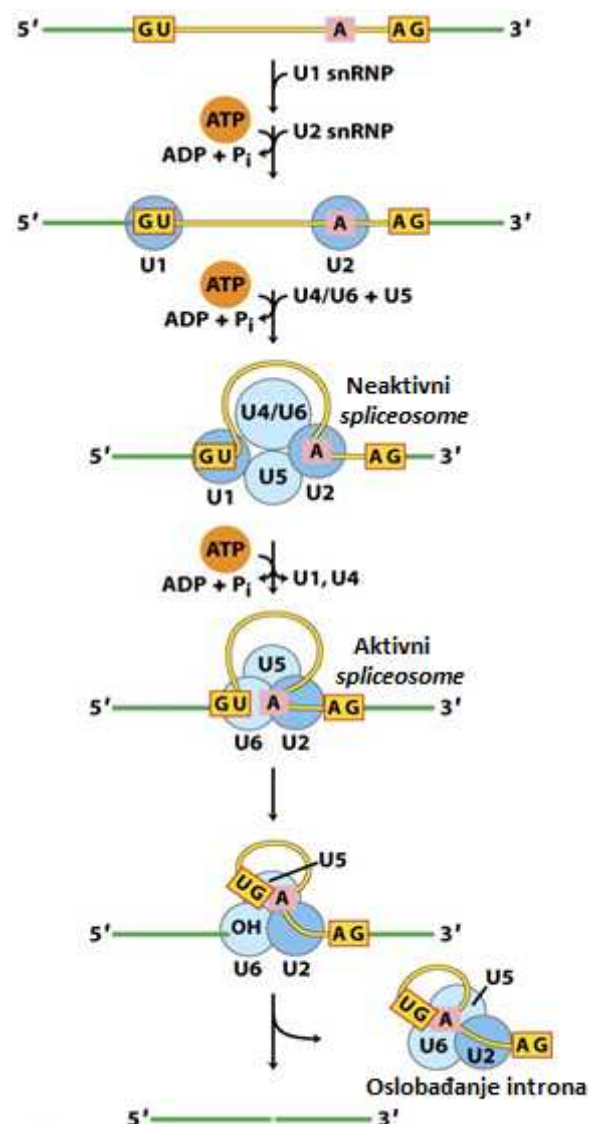


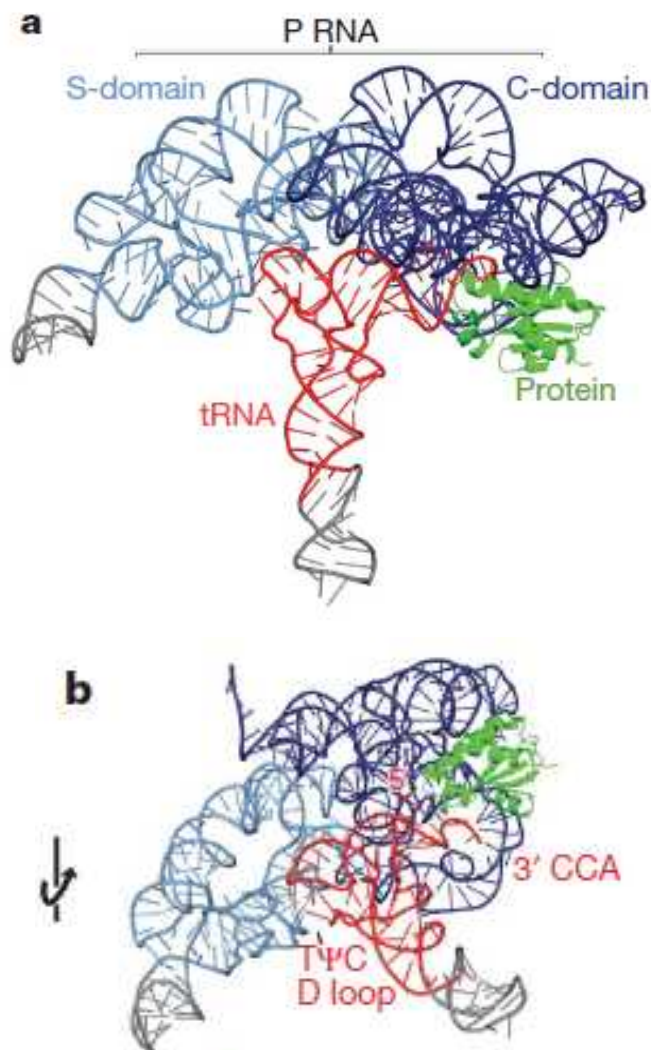
Figure 26-17b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Slika 8. Uloga snRNP *spliceosoma* u izrezivanju introna iz pre-RNA.

(Preuzeto iz Nelson i Cox 2008)

RNaza P katalizira endonukleolitičko cijepanje fosfodiesterne veze na 5' kraju pre-tRNA, što rezultira zreom molekulom tRNA. Na bakterijskom obliku ovog katalizatora je Altmann sa suradnicima otkrio katalitička svojstva RNA (istovremeno je laboratorij T. Čecha radio na *Tetrahymena*) (McClain i sur. 2010). Uočeno je da izolirana RNA domena, koja je trebala služiti isključivo kao negativna kontrola u istraživanju, katalizira reakciju cijepanja vode u regiji pre-tRNA (McClain i sur. 2010). Holoenzim RNaza P ima RNA komponentu koja je slična po nukleotidnom slijedu i strukturi u svim domenama života (izuzetak su mitohondrijske RNaze P koje su proteinski katalizatori [Holzmann i sur. 2008]), dok su proteinske komponente mnogo varijabilnije (McClain i sur. 2010). Sama ta činjenica ukazuje na važnu ulogu RNA.

Uočene su dvije neovisne domene unutar molekule RNA ovog kompleksa: domena kojom se ostvaruje specifična interakcija sa supstratom pomoću obojavnog slijeda i strukture prepoznaje T₁C₁ i D₁om₁ e pre-tRNA (*stacking* interakcije baza), te pojedine nukleobaze intermolekulskim sparivanjem baza, a katalitička domena sadrži aktivno mjesto (Reiter i sur. 2010) (Slika 9.). Kristalna struktura upućuje na mehanizam reakcije pomoću dva metalna iona: prvi pozicionira vezu koja podliježe cijepanju, a drugi ima ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja i prijenosu protona prilikom otpuštanja produkta (Reiter i sur. 2010). Ovaj je mehanizam čest u svijetu katalitičkih RNA. Glavna uloga proteinske komponente RNaze P je interakcija i pozicioniranje vode u 5' nukleotidnog slijeda pre-tRNA u kompleks (Reiter i sur. 2010).



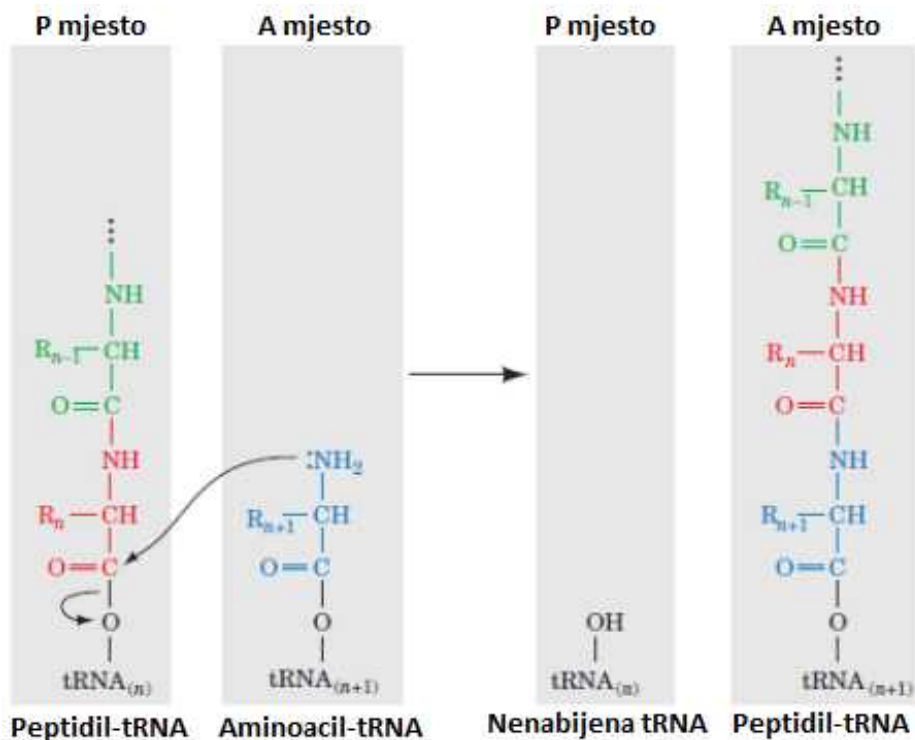
Slika 9. Kristalna struktura RNaza P holoenzima u kompleksu s tRNA iz organizma *T. maritima*. a) Vidljiva je RNA podjedinica od 110 kDa (plavo) s katalitičkom domenom (C) i domenom kojom se ostvaruje specifična interakcija sa supstratom (S), proteinska podjedinica od 14,3 kDa (zeleno) koja veže 5' vode u regiju pre-tRNA, te sama tRNA (crveno). b) Prikaz mjesta prepoznavanja tRNA i ribozima: 5' vode a regija tRNA, 3' CCA kraj, te obojene T i C i D om e.

(Preuzeto iz Reiter i sur. 2010)

Ribosom je veliki ribonukleoproteinski kompleks koji katalizira reakciju prijenosa peptidila: -amino skupina aminokiseline na A mjestu napada sp^2 -hibridiziran ugljikov atom karbonilne skupine aminokiseline na P mjestu, što rezultira nastankom amida i alkohola (Lilley 2003, Doudna i Lorsch 2005) (Slika 10.). Sa injavaju ga molekule RNA (dvije trećine mase) i proteini (jedna trećina mase). Molekule rRNA imaju centralnu poziciju u strukturi, a proteini se nalaze na površini kompleksa, okružuju RNA jezgru i popunjavaju šupljine između molekula RNA, dok samo neki pružaju dio polipeptidnog lanca prema jezgri (Slika

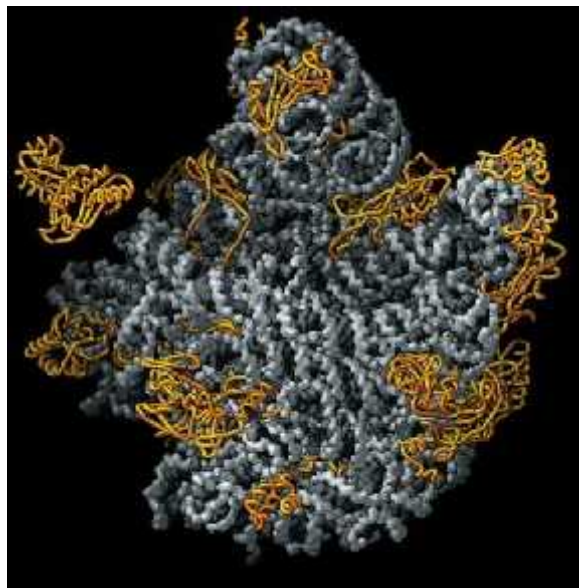
11.). Smatra se da proteini stabiliziraju RNA jezgru omogućujući i konformacijske promjene rRNA tijekom reakcije (Alberts i sur. 2008).

Dugo vremena se ribosom smatrao prevelikim za strukturne analize visoke rezolucije. Iako je još 1980. dobiven stabilni kristal 50S podjedinice ribosoma, tek 20 godina kasnije, 2000. godine su Ban i suradnici u časopisu *Science* objavili prvu kristalnu strukturu velike ribosomske podjedinice arheje *Haloarcula marismortui* u rezoluciji od 2,4 Å (opisano u preglednom radu Ramakrishnan 2002). Ova rezolucija je omogućila da se lociraju molekule vode, metalni ioni i eventualne promjene baza, te je značila veliki uspjeh u strukturnoj biologiji i krajnji dokaz da katalitičku aktivnost u sintezi proteina vrši molekula RNA (Ramakrishnan 2002, Lilley 2003). Naime, ribosom je kristaliziran s analogom prijelaznog stanja, tzv. „Yarus“ inhibitorom (C-C-dA-fosforamid-puromicin) koji ukazuje na aktivno mjesto, odnosno peptidil-transferazni centar. Jasno je vidljiva odsutnost proteinskih podjedinica u krugu od 18 Å od tog mjesta, te analog okružen molekulom 23S rRNA (Ramakrishnan 2002, Lilley 2003). Grupa znanstvenika koja je riješila kristalnu strukturu 50S podjedinice je iste godine objavila i drugi rad kojim objašnjava mehanističke implikacije otkrivene kristalne strukture (Nissen i sur. 2000). Ribosom ubrzava reakciju za faktor 10^7 u odnosu na reakciju u otopini, što je rezultat kombinacije više različitih katalitičkih strategija (Lilley 2003, Doudna i Lorsch 2005). Znanstvenici su ukazali na važnost pozicioniranja supstrata, odnosno tRNA na A i P mjestu pomoću 23S rRNA. Kao druga strategija predložena je stabilizacija prijelaznog stanja, na što direktno ukazuje struktura s „Yarus“ inhibitorom. Kao posljednji mehanizam predložena je uporaba kiselinsko-bazne katalize pomoću nukleobaze A2451 koja se nalazi dovoljno blizu analoga prijelaznog stanja da postoji mogućnost interakcije vodikovim vezama s prijelaznim stanjem. Da bi vršila tu funkciju, ova nukleobaza bi trebala biti protonirana na N3 i imati povišeni pK_a , što su dokazali pokusi pH-ovisne modifikacije dimetilsulfatom (Ramakrishnan 2002). Ipak, mutageneza na ovoj poziciji je slabo utjecala na aktivnost, što je dovelo u pitanje ulogu ove baze u kiselinsko-baznoj katalizi (DeRose 2002, Strobel i Cochrane 2007). Metalni ioni nisu nađeni u blizini aktivnog mjesta; iako su Mg^{2+} ioni potrebni za peptidil-transferaznu aktivnost, oni ne sudjeluju direktno u mehanizmu reakcije (De Rose 2002, Strobel i Cochrane 2007). Ostalo je stoga otvoreno pitanje koji su preostali mehanizmi katalize koji pomažu ribosomu da dostigne izmjereni faktor ubrzanja reakcije. Nedavno je predložen model katalize pomoću supstrata koji je detaljnije opisan u poglavlju 3.5.



Slika 10. Reakcija prijenosa peptidila koju katalizira 23S rRNA velike podjedinice ribosoma.

(Preuzeto iz Voet i Voet 2011)



Slika 11. Lokalizacija proteinskih komponenata (zlatno) i rRNA (5S i 23S; sivo) u velikoj podjedinici bakterijskog ribosoma. Prikazana je strana koja stvara interakciju s malom podjedinicom.

(Preuzeto iz Alberts i sur. 2008)

3. KAKO RNA KATALIZIRA KEMIJSKE REAKCIJE?

Uzimaju i u obzir strukturna i kemijska ograničenja molekule RNA objašnjena u poglavlju 2.3., nameće se pitanje: kako molekula RNA uspijeva postići i ubrzanje reakcija u rasponu 10^5 - 10^{11} u odnosu na reakcije u otopini (u nekim slučajevima skoro kao proteinski enzimi) (Doherty i Doudna 2001)?

Za početak, pokazano je da RNA može koristiti opću u kiselinsko-baznu katalizu dušičnim bazama u slučajevima kada je okolina takva da omogućava znatnu promjenu u pK_a neke funkcionalne skupine baze (Doudna i Cech 2002; Doudna i Lorsch 2005). RNA je, u usporedbi s enzimima, puno manje pogodna za kovalentnu katalizu, jer najčešće stvara nekovalentne interakcije, mahom vodikove veze između u lancu nukleinskih kiselina. S druge strane, čini se da katalitičke RNA često i uspješno koriste katalizu metalnim ionima. Osim toga RNA može, kao i proteini, vezati neke organske kofaktore i koristiti ih u katalizi (Strobel i Cochrane 2007). Zbog svoje kemijske prirode puno teže od proteinskih enzima kontrolira mikrookolinu aktivnog mjesta, ali, na tragu proteinima, uspješno koristi veznu energiju u katalizi, uključujući i interakcije udaljene od aktivnog mjesta (Narlikar i Herschlag 1997). Stvaranjem nekovalentnih interakcija, RNA orijentira i pozicionira supstrate (supstrat može biti i dio same molekule RNA) (Lilley 2003).

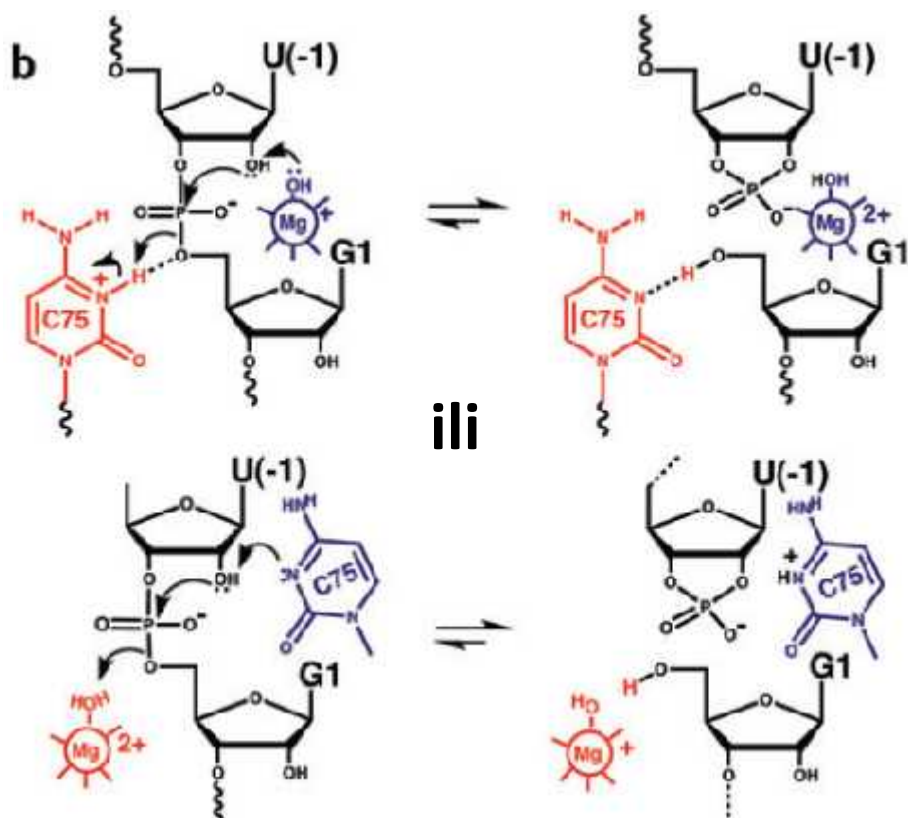
3.1. Kiselinsko-bazna kataliza

Molekula RNA ne raspolaže funkcionalnim grupama s pK_a bliskim fiziološkoj pH vrijednosti koje bi mogle služiti kao dobri proton-donori i akceptori u kiselinsko-baznoj katalizi (Narlikar i Herschlag 1997; Doudna i Lorsch 2005; Strobel i Cochrane 2007). Adenin i citozin bi mogli protonirati N1, odnosno N3 prstena, ali su pK_a vrijednosti 3,5 za adenin, odnosno 4,2 za citozin. To znači da su pri pH 7 ove dušične baze većinom u disociranom obliku. One su jake kiseline, ali pri fiziološkom pH je velik udio molekula u obliku konjugirane slabe baze koja ne može služiti u kiselinsko-baznoj katalizi. S druge strane, uracil i gvanin imaju previsoke pK_a vrijednosti – 9,8 za gvanin i 10,5 za uracil (Doudna i Cech 2002; Lilley 2003; Strobel i Cochrane 2007). Pri fiziološkom pH su ove baze mahom protonirane, ali sa slabim proton-donorskim svojstvima. Da bi RNA koristila kiselinsko-baznu katalizu pK_a

vrijednosti nukleobaza bi trebale biti znatno pomaknute prema fiziološkoj pH vrijednosti. Znatne promjene u pK_a vrijednosti koje upućuju na mogućnost kiselinsko-bazne katalize su pokazane NMR-om (Doudna i Cech 2002; Lilley 2003).

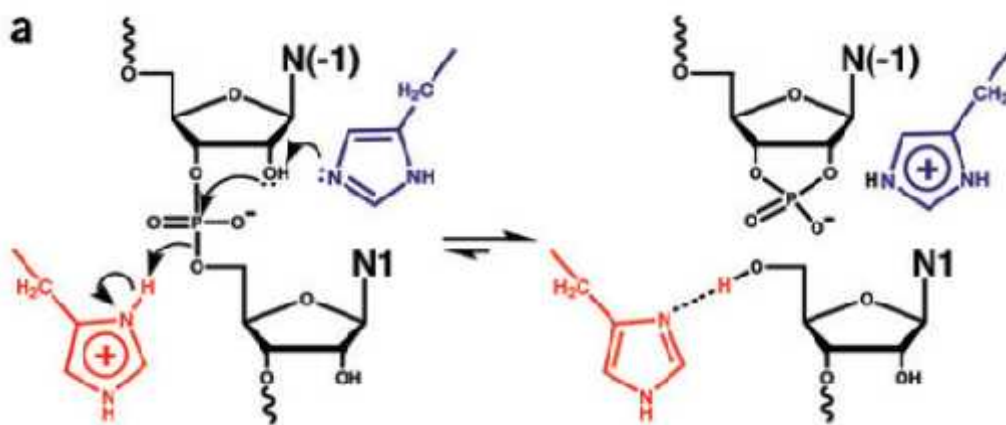
Riješena struktura ribozima iz HDV-a je otkrila da je katalitički esencijalan citidin C75 pozicioniran u blizini 5' hidroksila izlazeće skupine (Doudna i Lorsch 2005). Uz to, uočena je mreža vodikovih veza koje bi mogle stabilizirati protonirani oblik C75 i omogućiti ovoj bazi ulogu proton-donora ili proton-akceptora u reakciji (Doudna i Cech 2002) (Slika 12.). Daljnji pokusi su potvrdili tu ulogu. Mutacijom C75 se brzina reakcije smanjuje za faktor 10^5 , približno jednako kao kod mutacije jednog histidina u ribonukleazi A, enzima koji katalizira istu reakciju kao HDV koristeći kiselinsko-baznu katalizu pomoću dva histidina (Doudna i Lorsch 2005) (Slika 13.). Aktivnost ovako mutiranih ribozima se mogla djelomično povratiti dodatkom egzogenog imidazola koji može djelovati kao proton-donor ili proton-akceptor (Doudna i Cech 2002). Kinetički efekti izmjereni izotopima, uspoređivanje reakcijske pK_a s pK_a raznih analoga imidazola ili baza kojima je zamijenjen C75 upućuju na to da C75 ima direktnu ulogu u prijenosu protona tijekom reakcije (Doudna i Cech 2002; Doudna i Lorsch 2005). Zaključeno je da se pK_a C75 mijenja tijekom reakcije, zato što nije uočena značajna promjena u pK_a u osnovnom stanju ni u produktu (Doudna i Cech 2002; Doudna i Lorsch 2005). Još su u tijeku istraživanja i debate o toj ulozi C75 u katalizi. Lilley u svom radu iz 2003. godine brani hipotezu da C75 djeluje kao opća kiselina s pK_a blizu 6 (Lilley 2003; Stan Tsai 2006). S druge strane, Bevilacqua i Yajima nekoliko godina kasnije pišu o vjerojatnoj ulozi C75 kao opće baze, uz hidratizirani magnezij koji služi kao opća kiselina (Bevilacqua i Yajima 2006).

RNA ima puno slabije sposobnosti kontroliranja mikrookoline aktivnog mjesta od proteina. Smatra se da bi RNA mogla postići takve promjene u pK_a svojih šećera ili baza na način da ih pozicionira u blizinu negativno nabijenog fosforilnog kisika ili pozitivno nabijenog metalnog iona.



Slika 12. Prikaz dva moguća mehanizma kiselinso-bazne katalize kod HDV ribozima pomoću nukleobaze C75. U gornjoj slici C75 djeluje kao opća kiselina (crveno), a dolje kao opća baza (plavo). Reakcija uključuje nukleofilni napad 2'-OH skupine na susjedni atom fosfora uz nastajanje 2',3'-cikličkog fosfata.

(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)



Slika 13. Mehanizam ribonukleaze A u kojem dva histidina djeluju kao opća kiselina (crveno) i opća baza (plavo). Reakcija je analogna reakciji HDV ribozima prikazanoj na slici 12.

(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)

3.2. Kataliza metalnim ionima

Svi poznati ribozimi su osjetljivi na ionsku jakost otopine u kojoj se nalaze, a razlog tome je esto potreba za stabilizacijom negativno nabijenih skupina molekule RNA metalnim kationima. Sklapanje sekundarnih i tercijarnih struktura RNA stvaranjem nekovalentnih interakcija esto rezultira približavanjem višestruko negativno nabijenih fosfata; bez njihove stabilizacije sklapanje viših razina strukture RNA ne bi bilo mogu e (DeRose 2002). Istraživanja kataliti ke uloge metalnih iona su otežana utoliko što je teško mjerenjima razlikovati strukturnu od kataliti ke uloge metala (Narlikar i Herschlag 1997).

Dok proteini sadrže ograni en broj veznih mjesta za metale, RNA obiluje metalnim protuionima koordiniranim s okosnicom. Iako ta injenica otežava posao istraživa u, ona pove a vjerojatnost da se neki od tih iona pravilno pozicionira za katalizu. Stvara se mnogo lokalnih veznih mjesta i potencijalnih aktivnih mjesta. Metalni ioni ne koordiniraju samo nabijene fosfate; mogu vezati i 2' hidroksilnu skupinu riboze, te kisike i dušike purinskih i pirimidinskih baza (Narlikar i Herschlag 1997).

Ve ina enzima koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine koriste metalne ione u katalizi (npr. sve poznate RNA- i DNA-polimeraze) (Narlikar i Herschlag 1997; Strobel i Cochrane 2007). O ito je takav mehanizam katalize pogodan za ovaj tip reakcije. S obzirom da ve ina danas postoje ih i otkrivenih ribozima katalizira prijenos fosforila, kataliza metalnim ionima je proširena me u ribozimima, a molekula RNA je efikasna u provo enju ovakvog tipa katalize. Možda se RNA zadržala kao katalizator nekih reakcija prijenosa fosforila zato što efikasno može provoditi katalizu metalnim ionima koja je podobna za takve reakcije.

Divalentni kationi metala teoretski mogu imati više uloga u katalizi. Mogu koordinirati molekule vode koje sudjeluju u kiselinsko-baznoj katalizi (Lilley 2003). U po etnom dijelu reakcije mogu aktivirati nukleofil deprotonacijom, ili koordinirati nukleofil kako bi on postao podložniji deprotonaciji nekim drugim spojem (Doherty i Doudna 2001). U ve uznapredovaloj reakciji metalni kationi mogu elektrostatski stabilizirati prijelazno stanje (Lilley 2003). Mogu imati ulogu i u stabilizaciji nabijene izlazne skupine protonacijom ili direktnom koordinacijom kisika (Doherty i Doudna 2001).

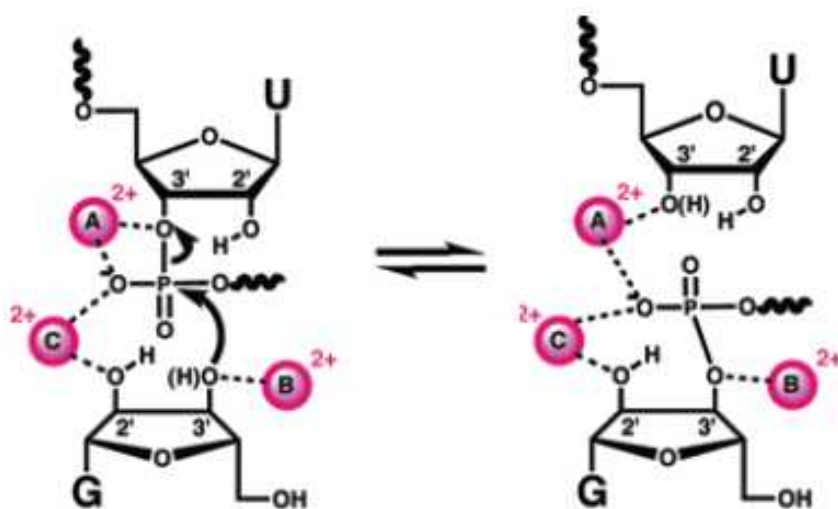
Kristalne strukture mogu dati uvid u položaj metalnih iona u reakcijskom stanju koje je kristalizirano. Na temelju blizine odre enih skupina katalizatora ili supstrata i metalnog iona se može spekulirati o eventualnoj kataliti koj ulozi metala. Egzaktnije informacije se dobivaju pokusima supstitucije kisika fosfatne skupine ili riboze sumporom ili amino skupinom, te

analiziranjem eventualnih promjena u efikasnosti reakcije zbog promijenjene specifičnosti vezanja metalnog iona (Doudna i Cech 2002). Najčešće su pokusi fosforotioatne supstitucije i „spašavanja“ tiofilnim metalnim ionom. Jedan od kisika fosfatne skupine okosnice RNA za koji se smatra da je koordiniran metalnim ionom se supstituira sumporom, tzv. elektronski „mekanim“ elementom (Strobel i Cochrane 2007). Mg^{2+} ion ima slabi afinitet za koordinaciju sumpora, pa se katalitička aktivnost bitno umanjuje ili inaktivira ako je supstituirana pozicija inače koordinirana s metalom koji ima ulogu u katalizi (Strobel i Cochrane 2007). Krajnji dokaz je mogućnost „spašavanja“, odnosno vraćanja aktivnosti RNA uz dodatak tiofilnog „mekog“ metala poput kadmija ili mangana koji koordiniraju sumpor s visokim afinitetom (Lilley 2003). Ipak, važno je oprezno interpretirati rezultate dobivene na ovaj način. Naime, supstitucija kisika vešnim atomom sumpora može uzrokovati redistribuciju naboja i lokalne konformacijske promjene molekule RNA, a dodani metali mogu kompenzirati nastalu konformacijsku promjenu (Narlikar i Herschlag 1997; DeRose 2002). Iako bi rezultati upućivali na metalni ion koji sudjeluje u katalizi, u ovom slučaju metalni ioni sudjeluju samo kao stabilizatori strukturnih nestabilnosti.

Jedna od situacija u kojima su rezultati fosforotioatnih supstitucija pružili varljive rezultate je slučaj *hammerhead* ribozima. Naime, kada se slobodni kisik fosfatne skupine na mjestu cijepanja RNA zamijeni sumporom, brzina reakcije ovisna o Mg^{2+} se smanji za faktor 10^3 - 10^5 . Aktivnost se može povratiti s Mn^{2+} i Cd^{2+} (DeRose 2002). Ovakvi rezultati su sugerirali znanstvenicima da metalni ioni direktno interagiraju s fosfodiesterom na mjestu cijepanja (Narlikar i Herschlag 1997). U *hammerhead* ribozimu postoji još jedno mjesto osjetljivo na fosforotioatne supstitucije, ali je ono daleko od aktivnog mjesta u kristalnoj strukturi osnovnog stanja. ^{31}P NMR je pokazao da kadmij koordinira supstituirani sumpor na tom mjestu udaljenom 20 Å od mjesta cijepanja (DeRose 2002). Istim NMR pokusom je bilo vrlo teško, gotovo nemoguće detektirati interakciju kadmija sa sumporom supstituiranim na mjestu cijepanja (DeRose 2002). Nakon toga je predloženo da u prijelaznom stanju dolazi do značajne konformacijske promjene koja udaljenu regiju RNA s koordiniranim metalom približava mjestu cijepanja, no molekularno modeliranje i kinetičke analize podržavaju hipotezu da metalni ioni u slučaju ovog ribozima nemaju katalitičku, već strukturnu ulogu (Doudna i Lorsch 2005).

Ribozimi za koje je na više načina potvrđeno da koriste metalne ione u katalizi su introni grupe I. Steitz i Steitz su postavili model katalize pomoću dva metalna iona, sukladno proteinskim enzimima koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine; prema ovom modelu jedan metal je trebao aktivirati nukleofil, a drugi stabilizirati izlaznu skupinu (Strobel

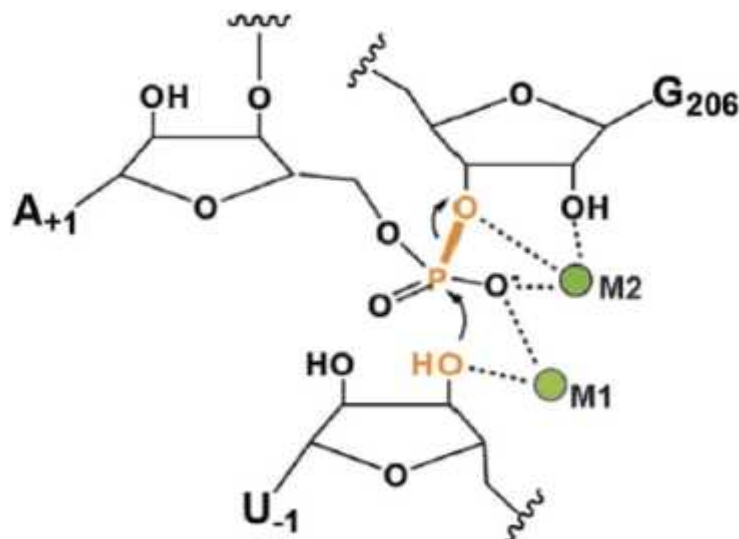
i Cochrane 2007). Fosforotioatne supstitucije su ovaj put pružile vrijedne informacije o položaju metalnih iona, te je predloženo da oni koordiniraju nukleofil, izlaznu skupinu, slobodni kisik na fosfatu koji se cijepa u reakciji, te 2'-OH skupinu susjednu izlaznoj skupini (Strobel i Cochrane 2007). Smatralo se da vjerojatno više od dva iona sudjeluju u koordinaciji tolikog broja skupina. Predložen je stoga mehanizam katalize s tri metalna iona (Slika 14.).



Slika 14. Mehanizam katalize reakcije introna grupe I pomoću tri metalna iona (A, B i C) predložen na temelju supstitucija kisika u aktivnom mjestu sumporom i amino skupinom.

(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)

Nakon što je dobiveno i analizirano više kristalnih struktura različitih stadija reakcije detektirana su ipak samo dva metalna iona koji koordiniraju sve četiri gore navedene skupine (Slika 15.) (Stahley i sur. 2007; Strobel i Cochrane 2007). Osim aktivacije nukleofila i stabilizacije, metali pomažu i u pozicioniranju supstrata (Doudna i Lorsch 2005). Uočljiva je analogija katalize dvama metalnim ionima kod introna grupe I i enzima koji kataliziraju reakcije prijenosa fosforilne skupine (DNA- i RNA-polimeraze) (Strobel i Cochrane 2007). Može se zaključiti da je ovakva struktura aktivnog mjesta i logika katalize nastala konvergentnom evolucijom barem dva puta neovisno, kod RNA i proteinskih katalizatora (Strobel i Cochrane 2007). činjenica da je priroda više od jednom došla do istog rješenja za ubrzavanje reakcija prijenosa fosforila govori o izrazitoj efikasnosti takvog mehanizma za ovaj tip reakcija.



Slika 15. Uloga dva metalna iona (M1 i M2 obojani zeleno) u katalizi reakcije introna grupe I. Reaktivne skupine i labilne veze su obojane naranasto. (Preuzeto iz Strobel i Cochrane 2007)

3.3. Elektrostatska kataliza

Elektrostatska kataliza je mehanizam kojeg ribozimi primjenjuju u stabilizaciji nabijenog prijelaznog stanja (Lilley 2003). Kristalne strukture *hairpin* ribozima su ukazale na nekoliko purinskih baza koje bi mogle biti uključene u kiselinsko-baznu ili elektrostatsku katalizu (Doudna i Lorsch 2005; Bevilacqua i Yajima 2006). Strukture u kojima je katalitički kritičan G8 supstituiran različitim analogima nisu uspjele pokazati u kojoj od navedenih dviju vrsta katalize on sudjeluje, ali su pokusi „spašavanja“ nukleobazama sugerirali da vjerojatno nije uključen u kiselinsko-baznu katalizu (Doudna i Lorsch 2005; Bevilacqua i Yajima 2006). Na temelju mjerenja ovisnosti reakcije o pH je ustanovljeno da dobiveni profil ovisnosti može biti rezultat korištenja protonirane baze u elektrostatskoj stabilizaciji naboja prijelaznog stanja, a ne prijenosa protona (Doudna i Lorsch 2005). Osim eventualne uloge u elektrostatskoj katalizi, G8 pomaže u pozicioniranju za katalizu i onemogućava neproduktivne konformacije osnovnog stanja (Bevilacqua i Yajima 2006).

Prema Coulombovom zakonu elektrostatske interakcije su to jače što je niža dielektrična konstanta okoline. Hidrofobno središte i hidrofobni bojni ogranci proteina, te pakiranje nabijenih i polarnih skupina u formirane trodimenzionalne strukture s ograničenom mogućnošću gibanja su faktori koji omogućavaju proteinima stvaranje i održavanje okoline niske dielektrične konstante u aktivnom mjestu (Narlikar i Herschlag 1997). S obzirom da

RNA nema potpuno hidrofobne boje ogranke, ona ne može stvoriti okruženje dielektrične konstante koja je usporediva s onom koju proteini mogu postići i u svom hidrofobnom središtu. Kao tome, slaba kemijska raznolikost raspoloživih reaktivnih skupina RNA i nabijena okosnica sprečavaju dovoljno zbijeno pakiranje molekule, što omogućava različite rearanžmane i pristup molekulama vode koje povećavaju dielektričnu konstantu (Narlikar i Herschlag 1997). Velik broj veza okosnice koje dozvoljavaju slobodnu rotaciju omogućava kretanje polarnih i nabijenih skupina, što je također povećava dielektričnu konstantu (Narlikar i Herschlag 1997). Zbog svih tih razloga je elektrostatska kataliza mnogo slabije zastupljena kod katalitičkih RNA nego što je to slučaj u enzimima.

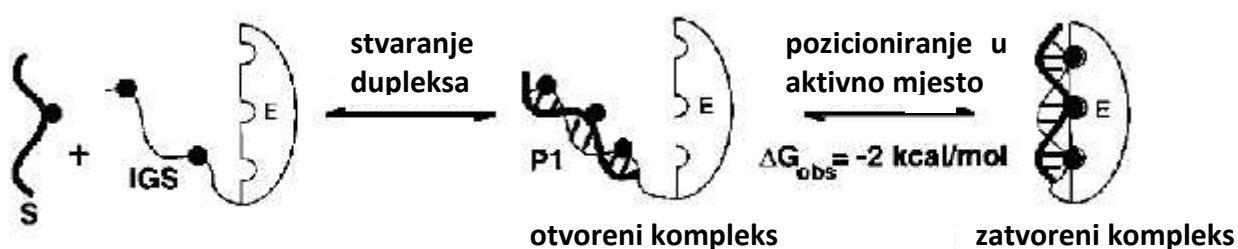
3.4. Vezna energija u katalizi

Upotreba vezne energije u katalizi je općenito značajka bioloških katalizatora. Rigidnost strukture omogućava postizanje maksimalne specifičnosti interakcija s prijelaznim stanjem u odnosu na osnovno stanje (Narlikar i Herschlag 1997). Proteini su po tom pitanju u znatnoj prednosti zbog već navedenih razloga koji čine molekulu RNA labilnije pakiranom i općenito fleksibilnijom. Predloženo je da zbog tog razloga molekule RNA moraju biti veće, što omogućava stvaranje većeg broja interakcija, da bi postigle isti stupanj rigidnosti aktivnog mjesta kao mnogo manje molekule proteina (Narlikar i Herschlag 1997). To bi mogao biti i jedan od razloga zašto su veliki ribozimi (introni grupe I, RNaza P, ...) katalitički djelotvorniji od malih (*hammerhead*, HDV, ...); faktor ubrzanja katalizirane reakcije u odnosu na nekataliziranu dostiže 10^{11} za velike ribozime, a samo 10^6 za male (Narlikar i Herschlag 1997).

Dobar primjer korištenja vezne energije u katalizi u svijetu katalitičkih RNA je intron grupe I iz *Tetrahymena*. Dio RNA koji predstavlja supstrat stvara dupleks s unutarnjim vodom slijedom nukleotida (*internal guide sequence*, IGS) katalitičkog introna (Narlikar i Herschlag 1997). Nastala P1 uzvojnica ulazi u tercijarne interakcije s drugim dijelovima ribozima stvaraju i rigidniju katalitičku aktivnu strukturu. No, energetske doprinose tercijarne stabilizacije je mnogo manji nego što bi se zaključilo zbrajanjem doprinosa pojedinačnih interakcija (Slika 16.). Pretpostavlja se da postoji energetska barijera za pozicioniranje P1 uzvojnice u aktivno mjesto, i ona se kompenzira veznom energijom tercijarnih interakcija (Narlikar i Herschlag 1997). U ovom slučaju vezna energija služi u pozicioniranju supstrata.

Kao što je već ranije navedeno, i metalni ioni pridonose uspješnom pozicioniranju kod ovog ribozima.

Mjerenja su pokazala i da je tercijarna stabilizacija oligonukleotida analognog supstratu vezanog u aktivnom mjestu 40 puta bolja za oligonukleotid kojemu nedostaje fosfodieterska veza koja se cijepa u odnosu na cjeloviti supstrat. To upućuje na destabilizirano osnovno stanje u odnosu na produkt (Narlikar i Herschlag 1997). Destabilizaciji osnovnog stanja pridonosi i koordinacija iona Mg^{2+} s 3' kisikom izlazne skupine (Slika 15.); u osnovnom stanju je prisutna fosforilna skupina koja privlači elektrone, pa je postojeća interakcija s metalom slabija i nepovoljnija od interakcije kisika izlazne skupine s vodom (Narlikar i Herschlag 1997) (interakcija s vodom se uzima za usporedbu; to znači da je interakcija koja se formirala u osnovnom stanju nepovoljnija od interakcije koja je postojala u otopini između supstrata i vode). U prijelaznom stanju 3' kisik izlazne skupine dobiva parcijalni negativni naboj, a veza s fosforilnom skupinom slabi ili je već prekinuta, što uzrokuje znatnu stabilizaciju ove interakcije u odnosu na osnovno stanje i na interakciju s vodom. Ove i slične interakcije stabilizacije prijelaznog stanja uz destabilizaciju osnovnog stanja pridonose za faktor 10^4 ukupnom faktoru ubrzanja reakcije ovim ribozimom (10^{11}) (Narlikar i Herschlag 1997).



Slika 16. Upotreba vezne energije za pozicioniranje supstrata i destabilizaciju osnovnog stanja. S je supstrat koji, vežući se za IGS introna, formira P1 uzvojnica koja stvara tercijarne interakcije s drugim dijelovima ribozima. Zbroj tercijarnih interakcija bi bio $-11,0 \text{ kcal mol}^{-1}$, ali je uočena tercijarna stabilizacija samo 2 kcal mol^{-1} .

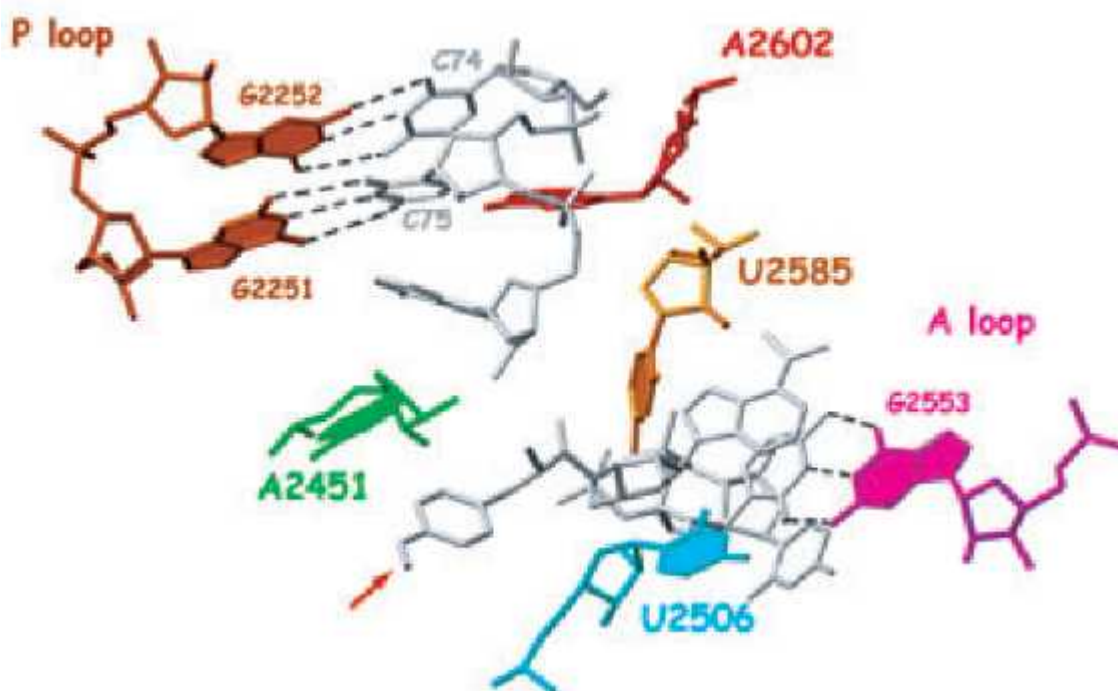
(Preuzeto iz Narlikar i Herschlag 1997)

3.5. Ostali mehanizmi katalize

Kovalentna kataliza kod ribozima je uočena kod introna grupe I iz *Tetrahymena* nakon što je RNA modificirana u pravi katalizator sa sposobnošću obrta. Narlikar i Herschlag u radu iz 1997. g. navode korištenje 1. razreda kovalentne katalize (nukleofil enzima je po strukturi i

reaktivnosti sli an terminalnom akceptoru). Smatraju da nukleofilni G djeluje kao intermedijarni akceptor prije nego što se potpuno prenese na oligonukleotid transesterifikacijom (Narlikar i Herschlag 1997). Ovo je jedan od rijetkih podataka u literaturi koji upu uje na upotrebu kovalentne katalize od strane ribozima. Zbog ve navedenih razloga RNA nije sklona stvaranju kovalentnih interakcija.

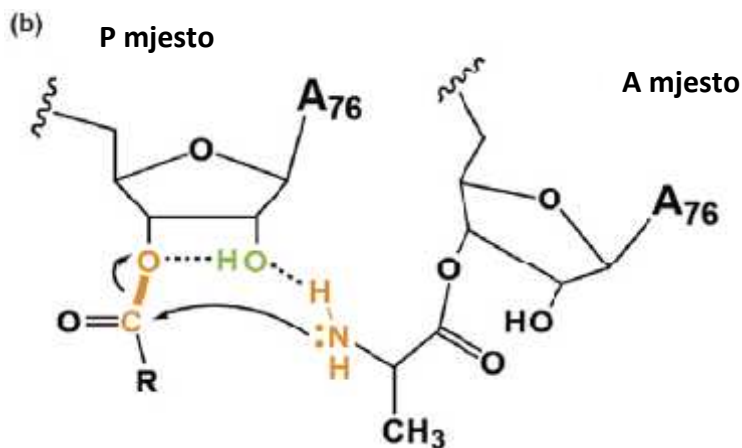
Jedan posebno zanimljiv na in katalize uo en na primjeru ribosoma je supstratom potpomognuta kataliza. Mjerenja su pokazala da zamjena ili delecija nukleotida A76 tRNA na P mjestu, odnosno posljednjeg nukleotida na 3' kraju peptidilne tRNA, rezultira potpunim gubitkom peptidil-transferazne aktivnosti (Strobel i Cochrane 2007). Doprinos ovog nukleotida u katalizi je ve i od doprinosa bilo kojeg nukleotida ribosomske RNA (Slika 17.). 2'-OH skupina riboze A76 je pozicionirana izme u nukleofilne amino-skupine aminokiseline vezane na tRNA u A mjestu i vlastitog 3' kisika (izlazna skupina) (Strobel i Cochrane 2007) (Slika 18.). S obzirom da je pK_a 2'-OH skupine vrlo visok (≈ 12), a ništa u strukturi aktivnog mjesta ribosoma ne upu uje na mogućnost da se taj pK_a bitno smanji, u tijeku su istraživanja koja bi mogla otkriti na koji na in ova skupina sudjeluje u katalizi (Strobel i Cochrane 2007). Unato nejasnom mehanizmu, ostaje vrlo zanimljiva injenica koja je otkrivena na ovom primjeru: funkcionalna skupina supstrata (koji je tako er RNA) može zna ajno sudjelovati u katalizi.



Slika 17. Prikaz aktivnog mjesta ribosoma. A mjesto je obojano ljubi asto, a P mjesto sme e. Ove petlje su u interakciji s tRNA supstratima (sivo). Aminokiselina vezana za tRNA u A mjestu je ozna ena crvenom

strjelicom. Peptid u nastanku nije prikazan. U P mjestu nakon C74 i C76 slijedi A76 nukleotid za koji se predlaže uloga u katalizi. Nukleotidi A2451, U2506, U2585 i A2602, unatoč položaju u aktivnom mjestu, nemaju toliki utjecaj na katalizu.

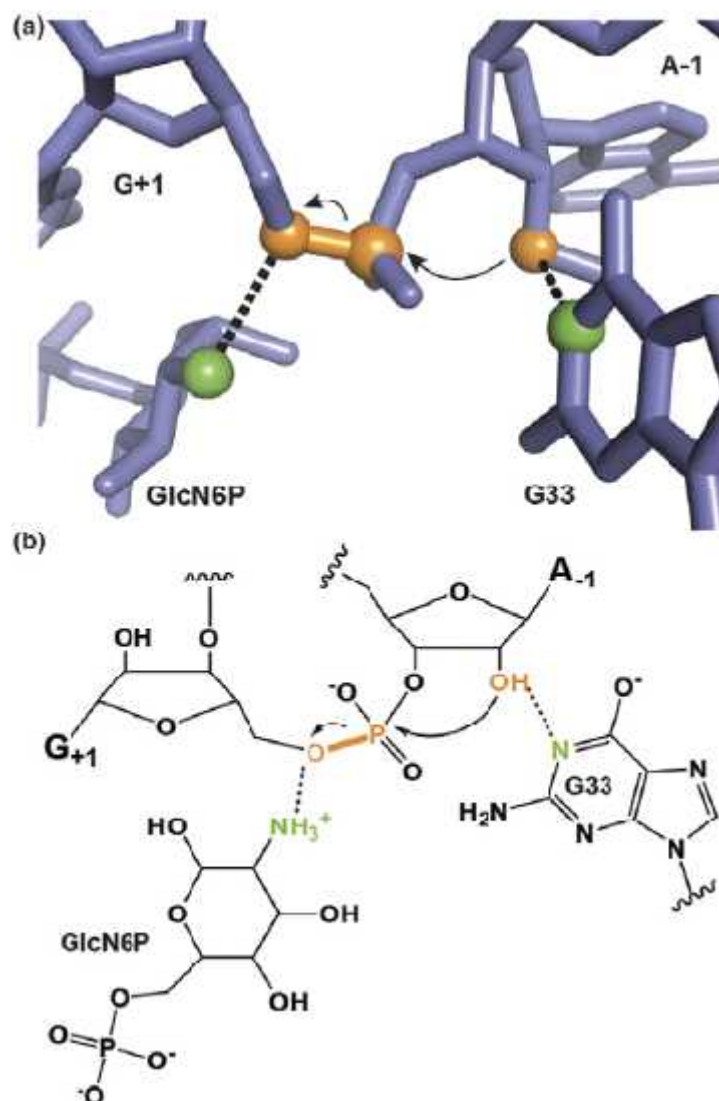
(Preuzeto iz Doudna i Lorsch 2005)



Slika 18. Predloženi mehanizam reakcije u aktivnom mjestu ribosoma uz sudjelovanje A76 tRNA.

(Preuzeto iz Strobel i Cochrane 2007)

Poput proteina, i katalitičke RNA mogu koristiti kofaktore u katalizi. To je dokazano *in vitro* selekcijom (Narlikar i Herschlag 1997), a zanimljiv primjer u prirodi je *glmS riboswitch* koji se nalazi 5' od gena za glukozamin-6-fosfat sintetazu. U prisutnosti glukozamin-6-fosfata (GlcN6P) ovaj ribozim cijepa vlastitu mRNA i na taj način smanjuje ekspresiju tog proteina (Strobel i Cochrane 2007). Ova molekula nije tipični *riboswitch* koji konformacijskom promjenom u prisutnosti liganda utječe na transkripciju ili translaciju (npr. stabiliziraju i aktivnu konformaciju ribozima koja cijepa vlastitu mRNA). Istraživanja su pokazala da ligand u ovom slučaju direktno sudjeluje u katalizi (Slika 19.). pK_a vrijednost amino skupine glukozamin-6-fosfata podržava tezu da glukozamin-6-fosfat sudjeluje u prijenosu protona; nije još poznato djeluje li kao baza aktivirajući nukleofil ili kao kiselina aktivirajući izlaznu skupinu (Strobel i Cochrane 2007).



Slika 19. Autokataliti ko cijepanje RNA *glmS* ribozima uz kemijsko sudjelovanje liganda GlcN6P.

a) Prikaz aktivnog mjesta. b) Reakcijski mehanizam. G33 je važan za reakciju, ali nije potpuno jasna njegova uloga.

(Preuzeto iz Strobel i Cochrane 2007)

4. IZREZIVANJE INTRONA IZ PRIMARNIH TRANSKRIPATA

Transkripcijom DNA slijeda u RNA nastaju primarni transkripti koji nisu nužno funkcionalni. Najčešće je potrebna jedna ili više posttranskripcijskih modifikacija da bi se primarni transkript preveo u zrelu molekulu RNA. Ovakve modifikacije uključuju endonukleolitičko ili egzonukleolitičko odcjepljivanje određenog segmenta RNA, dodatak jednog ili više nukleotida na 5' ili 3' kraj RNA, ili kemijsku modifikaciju nukleozida unutar molekule RNA (Voet i Voet 2011). Primarni transkripti tRNA i rRNA su najčešće modificirani nukleazama koje izrezuju iz njih krajeve koji će postati funkcionalne RNA, ili koje uređuju krajeve RNA (npr. RNaza P uređuje 5' kraj tRNA). tRNA i rRNA često podliježu i modifikaciji baza modificiraju ih enzimima. Prokariotske mRNA najčešće ostaju nepromijenjene, što omogućuje da translacija teče usporedno s transkripcijom. Zbog toga se dugo mislilo da su svi geni kontinuirani. 1977. je šokiralo otkriće da većina eukariotskih gena (i neki prokariotski) sadrže nekodirajuće nukleotidne sljedove – introne (Nelson i Cox 2008). Štoviše, u viših eukariota većina dio genoma otpada na introne nego na eksone (kodirajuće regije gena). Eukariotske pre-mRNA, nakon dodavanja m⁷G kape na 5' kraju i poli-A repa na 3' kraju, moraju proći kroz proces izrezivanja introna i ligacije eksona. Neke rRNA i tRNA koje sadrže introne također moraju proći ovakvu obradu.

Moguće je razlikovati četiri skupine introna. Introni grupe I i introni grupe II su samoizrezujući, a njihov mehanizam je ukratko bio opisan u 2. poglavlju. Hidroliza molekule s visokoenergetskim vezama (ATP, GTP) nije potrebna za njihovo izrezivanje zato što je svaki korak ligacije sparen s reakcijom cijepanja, stoga se nova veza stvara na teret kidanja stare veze, što omogućava energetska ravnotežu (Kruger i sur. 1982; Nelson i Cox 2008). Treća, najveća skupina introna uključuje introne jezgrinih pre-mRNA koji nisu samoizrezujući, već doradu vrši ribonukleoproteinski kompleks *spliceosome*. Posljednju, četvrtu skupinu čine introni nekih tRNA čija obrada uključuje endonukleazu koja cijepa fosfodieterske veze s obje strane introna i ATP koji sudjeluje u reakciji ligacije eksona (Nelson i Cox 2008).

Postojanje introna je opravdano s dva gledišta: promatrano evolucijski, postojanje takvih slijedova unutar gena omogućava lakše nastajanje raznovrsnijih kombinacija kod postanka novih gena koji kodiraju proteine. S druge strane, oni daju i trenutnu prednost: introni mnogih

gena se mogu izrezivati na različite načine, što je često tkivno-specifično, a rezultira time da se jedan gen može translatirati u više različitih proteina, što uvelike povećava kodirajući potencijal genoma (Alberts i sur. 2008).

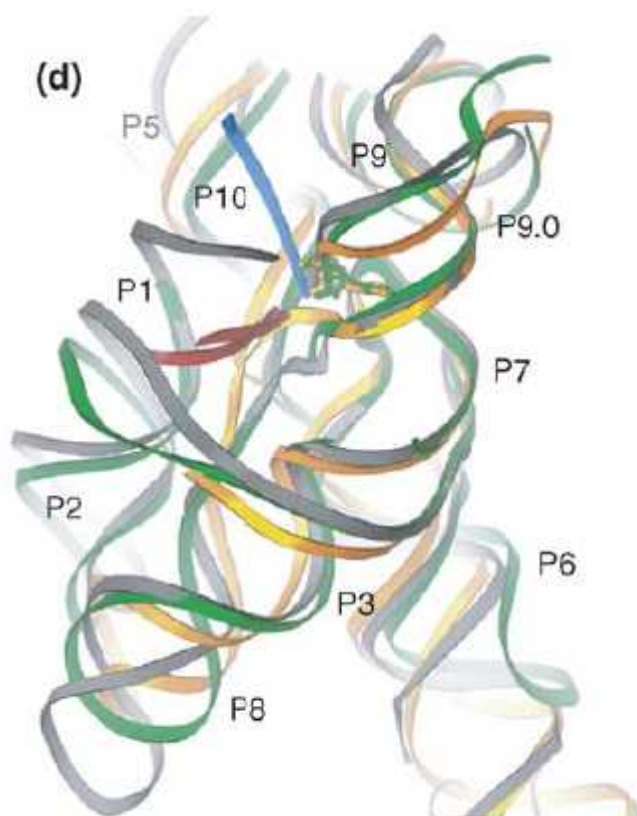
4.1. Introni grupe I – po čemu istraživanja

U radu iz 1982. godine Kruger i suradnici objavljuju da je sposobnost izrezivanja introna (IVS – *intervening sequence*) i spajanja eksona u nezreloj 26S rRNA kod vrste *Tetrahymena thermophila* intrinzična strukturi molekule RNA. Autori navode nekoliko svojstva ovog introna koji ga čine nalik enzimu. Zapravo, snižava energiju aktivacije za reakcije kidanja i stvaranja veza. Osim toga, aktivnost ovisi o toj strukturi, a gubi se pri visokim temperaturama ili koncentracijama formamida i uree. Treće, IVS ima specifično vezno mjesto za G kofaktor. I na kraju, dvije ili više domena molekule RNA stvaraju aktivno mjesto koje ne dozvoljava pristup vodi. Ipak, jasno je naglašeno da se IVS ne može smatrati pravim enzimom zbog toga što ovaj intron izrezuje samog sebe, nakon čega nije u stanju katalizirati nove reakcije izrezivanja introna i povezivanja eksona (Kruger i sur. 1982).

Još u ranijim radovima je bilo navedeno da se IVS cirkularizira nakon što biva izrezana kao linearna molekula, a 1982. je ponovno objavljen eksperimentalni dokaz u obliku gelova na kojima je vidljiva razlika u elektroforetskoj pokretljivosti linearnog i cirkularnog oblika molekule. Objavljen je i eksperimentalni dokaz da se eksoni ligiraju nakon ekscizije IVS-a: nakon izlaganja uvjetima koji potiču eksciziju, molekuli je omogućena hibridizacija s rDNA komplementarnoj po slijedu nukleotida RNA supstratu bez introna. Nakon uklanjanja jednolančanih dijelova elektroforetski je bilo moguće vizualizirati veličinu hibridiziranih dijelova – ligiranih eksona (Kruger i sur. 1982). Autori spomenutog rada idu i korak dalje naglašavaju i o postojanju drugih katalitičkih RNA. Vrlo pronicljivo navode kako pre-mRNA vjerojatno nisu samoizrezujuće, ali postoji mogućnost da u izrezivanju njihovih introna sudjeluju mali jezgrini RNP-ovi koji se mogu ubrajati u ribozime ako njihova RNA domena sudjeluje u katalizi. Na ovaj način autori otvaraju mogućnost postojanja ribozima koji djeluju *in trans*.

4.2. Introni grupe I – struktura

četiri različite kristalne strukture introna grupe I su poznate: struktura introna iz *Azoarcus* (pri rezoluciji od 3,1 Å i 3,4 Å) i *Tetrahymena* (3,8 Å), te struktura introna iz faga Twort (3,6 Å) (Stahley i sur. 2007). Unatoč tome što su strukture dobivene iz introna s različitim modifikacijama, a posljedica toga je i nepostojanje nekih metalnih iona u strukturi u nekim slučajevima, jasno je da svi ovi introni stvaraju slične sekundarne i trodimenzionalne strukture (Slika 20.).



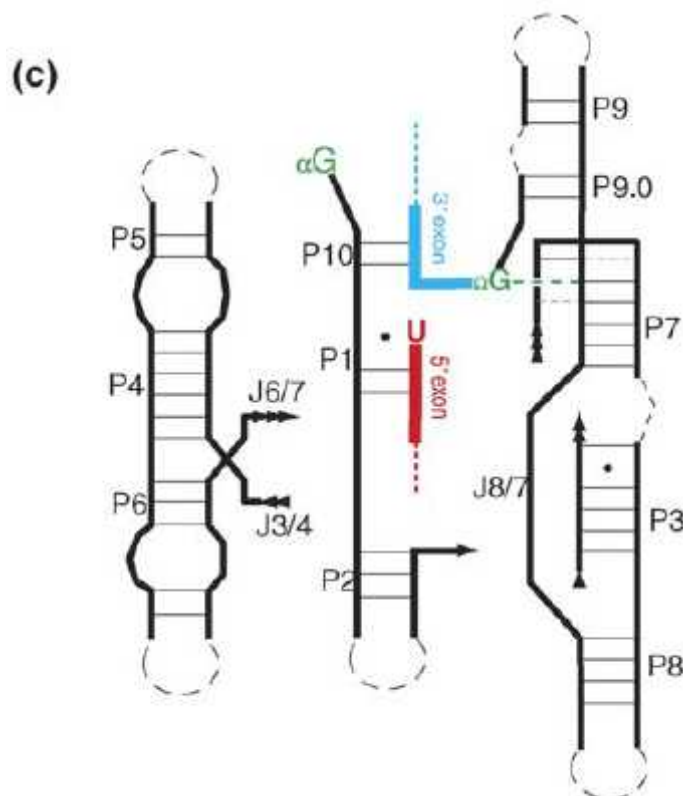
Slika 20. Superpozicija strukture introna grupe I iz *Azoarcus* (sivo), *Tetrahymena* (žuto) i faga Twort (zeleno).

Vanjski G je prikazan u obliku kuglica i štapića i označava aktivno mjesto. Plavo je prikazan 3' ekson iz *Azoarcus*, a crveno 5' eksoni iz *Azoarcus* i Twort.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

Katalitičko središte introna grupe I je velikim dijelom zaštićeno od prodiranja otapala. Sastoji se od dviju skupina zavojnica koje su vrlo očuvane: P5-P4-P6 i P7-P3-P8. U utroru između njih se veže P1, odnosno uzvojnica supstrata i IGS koja ostvaruje tercijarne interakcije s regijama J6/7, J4/5 i J8/7 (J dolazi od *joiner regions* – regije koje povezuju uzvojnice) (Doherty i Doudna 2001; Stahley i sur. 2007) (Slika 21.). Većina introna grupe I ima periferne elemente čija delecija ne inhibira samoizrezivanje, ali ga čini manje efikasnim.

To su dijelovi regija P9.0 i P9, te P2 na slici 21. (Doherty i Doudna 2001). Funkcija ovakvih elemenata je stabilizacija katalitičkog središta.

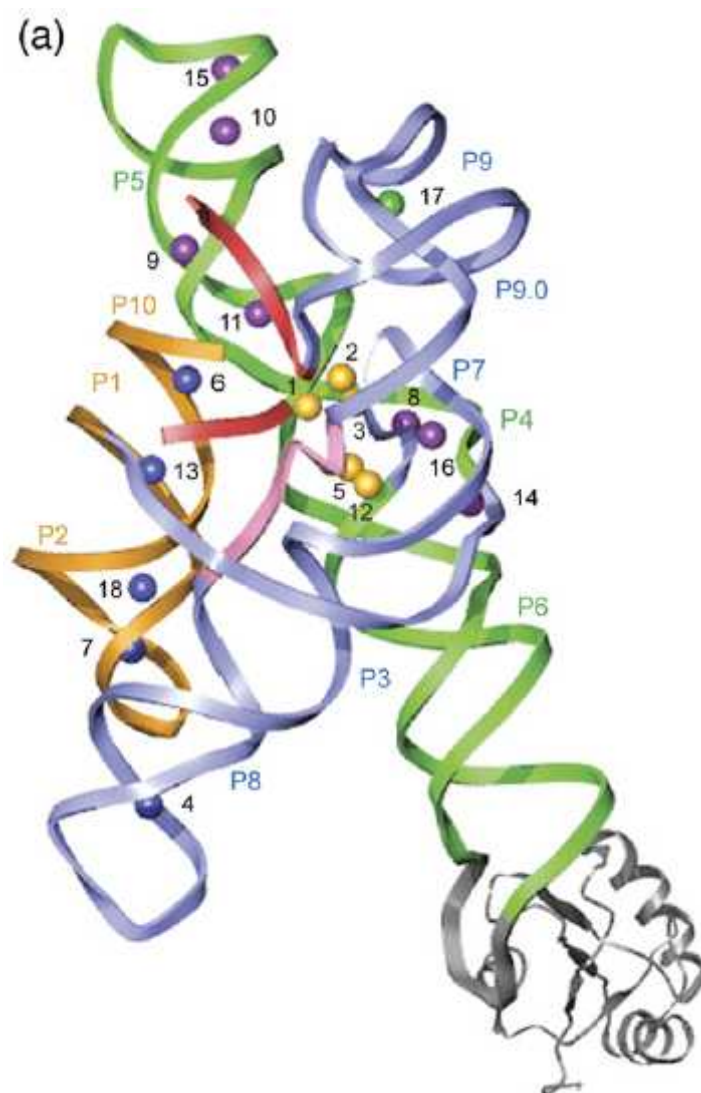


Slika 21. Sekundarna struktura introna grupe I. Ovu strukturu prikazuje kao složen mrežasti dijagram s različitim regijama označenim kao P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P9.0, P10, J3/4, J6/7, J8/7. Centralni dio strukture uključuje 5' ekson (crvena linija) i 3' ekson (plava linija). Na 3' eksonu je označen αG. Tanka crna linija prikazuje interakciju između αG i vanjskog G u G-veznom mjestu. Dugme sa strelicama pokazuje promjenu nakon transesterifikacijske reakcije, kada je G s 3' eksona zamijenio vanjski G u G-veznom mjestu.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

Kristalna struktura introna iz *Azoarcus* je otkrila položaj 18 metalnih iona (Mg^{2+} i K^{+}). S obzirom na ovisnost strukture karakteristične za introne grupe I, otkriva se da otkrivena vezna mjesta za metale postoje i u ostalim intronima ove skupine (Stahley i sur. 2007). Pet metalnih iona se nalaze duboko u strukturi ribozima i čine metalnu jezgru, a svaki se nalazi na manje od 12 Å od veze koja podliježe cijepanju (Slika 22.). Stvaraju mnoge interakcije s kisicima iz fosfata i šećera, a pozicionirani su na način da zasjenjuju negativni naboj fosfata, pozicioniraju nukleotide iz različitih strukturnih elemenata unutar aktivnog mjesta i/ili sudjeluju u samom prijenosu fosforila (Stahley i sur. 2007). U ovih pet metalnih iona spadaju i M1 i M2 koji su primarno katalitički, iako pomažu i u stvaranju pogodne strukture aktivnog mjesta. Aktivno mjesto se sastoji od regija J6/7, J4/5 i J8/7, te tri nukleotida supstrata čiji negativni naboji fosfata stvaraju veliku koncentraciju naboja u blizini veze koja podliježe cijepanju (Stahley i sur. 2007). Katalitički magnezijevi ioni stvaraju interakcije sa svim ovim

komponentama stvaraju i okolinu pogodnu za odvijanje reakcije. Ostali ioni metalne jezgre ne stvaraju interakcije u samom aktivnom mjestu, ali su bitni za aktivnost jer su ključni u interakcijama između u pojedinim regijama i sklapanju određenih sekundarnih struktura (Stahley i sur. 2007). Domena P4-P6 je strukturno vrlo bitna jer se ostale dvije uzvojnice (P1 i P7-P3-P8) pozicioniraju u njezin veliki i mali udjel. Četiri od pet metala jezgre, te još sedam dodatnih metala stvaraju interakcije s tom domenom (Stahley i sur. 2007) (Slika 22.).



Slika 22. Raspored metalnih iona u kristalnoj strukturi introna grupe I iz *Azoarcus*. Metali koji čine metalnu jezgru su narančasti (M1-M3, M5 i M12). Tu spadaju i katalitički ioni M1 i M2. Metalni ioni smješteni u regijama P10-P2 i P8 su plavi. P4-P6 uzvojnica koordiniraju metale obojene ljubičasto, ali i četiri od pet metala koji čine metalnu jezgru. Metali u perifernim regijama P9.0-P9 su označeni zeleno.

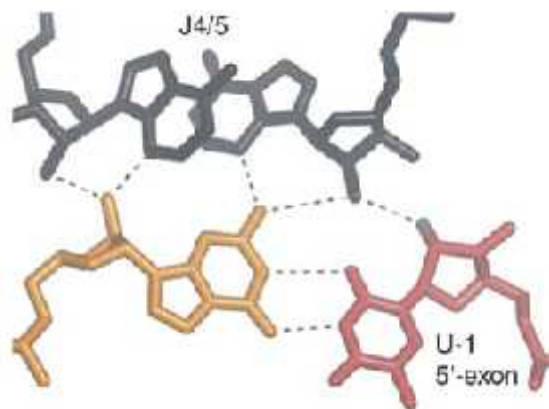
(Preuzeto iz Stahley i sur. 2007)

4.3. Introni grupe I – odabir mjesta cijepanja

Izrezivanje introna mora biti krajnje točno. Cijepanje fosfodieterske veze na na in da jedan od eksona sadrži jedan nukleotid viška ili manjka će značiti pomak okvira čitanja u translaciji i nastanak nefunkcionalnog proteina. Jasno je, dakle, koliko je presudna sposobnost selektiranja točnih dviju veza koje treba cijepati između stotina fosfodieterskih veza u slijedu nukleotida RNA.

5' mjesto cijepanja se prepoznaje zahvaljujući stvaranju jednog kolebljivog baznog para između terminalnog nukleotida 5'eksona, U-1, i specifičnog G unutar introna. Oba nukleotida su obojčana. Uzvojnica supstrata, P1, stvara interakcije s A bogatim regijama J4/5 i J8/7 koje se smatraju važnima za selekciju mjesta cijepanja. Na J4/5 se nalazi receptor kolebljivog para koji se sastoji od dva A-A bazna para, a prepoznaje egzociklični amin gvanina i 2'-OH šećera gvanozina iz G-U-1 kolebljivog para baza (Stahley i Strobel 2006) (Slika 23.). Osim veze između G i U-1, ekson i intron stvaraju i druge interakcije. Već spomenuti IGS nukleotidni slijed introna je uvijek komplementaran određenom broju nukleotida (oko 6) na regiji 5' eksona koja prethodi intronu (Garriga i sur. 1986). Ove interakcije nisu obojčane i nukleotidni slijedovi su varijabilni kod različitih vrsta introna.

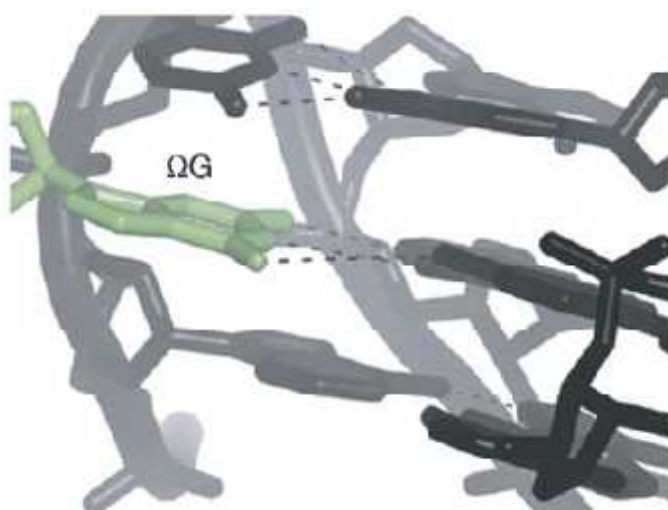
Vezno mjesto za 5' ekson mora biti dobro definirano jer njegova fiksna pozicija u odnosu na G-vezno mjesto omogućava selekciju veze koja treba biti pocijepana. Osim toga, vezno mjesto orijentira 5' ekson na pravilan način prema 3' mjestu cijepanja na način da se, nakon napada vanjskog G i oslobađanja 3'-OH nukleofila, ligacija eksona može odvijati uz sniženu energiju aktivacije zbog blizine i međusobne orijentacije supstrata (Garriga i sur. 1986). Važno je da 5' ekson ne disocira između prve i druge transesterifikacijske reakcije. Kada bi bio vezan samo Watson-Crickovim interakcijama on bi napustio aktivno mjesto prije završetka kemijskog koraka, ali bez ubravanja vremena potrebnog za konformacijske promjene između dva koraka. No, smatra se da tercijarne interakcije znatno usporavaju disocijaciju 5' eksona i omogućavaju da on ostane vezan svo vrijeme potrebno za odvijanje obiju reakcija transesterifikacije (Narlikar i Herschlag 1997).



Slika 23. Selekcija 5' mjesta cijepanja. Kolebljivi bazni par G·U-1 je prepoznat od strane A u J4/5 regiji introna.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

U selekciji 3' mjesta cijepanja sudjeluje o uvani terminalni G introna (to je nukleotid koji se veže u G-vezno mjesto u drugoj transesterifikacijskoj reakciji). On stvara triplet s G·C parom u uzvojnici P7 (Slika 21.) (Stahley i Strobel 2006). Ovaj triplet se pozicionira izme u druga dva tripleta P7 zavojnice koja na taj na in stvara G-vezno mjesto (Slika 24.). Stoga terminalni G introna je selektiran vodikovim vezama, ali i hidrofobnim interakcijama me u bazama (*stacking*) (Stahley i Strobel 2006). Še er ovog G nukleotida ostaje stršiti u kataliti ko središte gdje sudjeluje u mehanizmu reakcije. Vezanje G u svoje vezno mjesto ide u dva koraka: po etno nespecifi no vezanje inducira konformacijsku promjenu koja pozicionira G u aktivnu orijentaciju (Stahley i Strobel 2006).



Slika 24. Terminalni G introna (ΩG) stvara triplet s G·C baznim parom u uzvojnici P7, u središtu G-veznog mjesta. Ispod i iznad je nukleotid prepoznat zahvaljuju i *stacking* interakcijama.

(Preuzeto iz Stahley i Strobel 2006)

4.4. Introni grupe I – rezultati kineti kih analiza

Analizirana je reakcija analogna prvoj transesterifikacijskoj reakciji introna grupe I, tj. reakcija cijepanja oligonukleotida $G_2CCCUCUA_5$ pomoću u vanjskog G katalizirana kra im oblikom IVS (L-21 *ScaI* RNA). Zamijetna vrijednost k_{cat}/K_m je bila $(9 \pm 3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, što je bilo vrlo blizu izračunatoj vrijednosti (Herschlag i Cech 1990b). Zamjena G s GTP nije imala nikakav utjecaj na tu vrijednost. Kemijski korak ($k_c = 350 \text{ min}^{-1}$) se pokazao mnogo bržim od disocijacije supstrata iz kompleksa s ribozimom i G kofaktorom ($k_{off} = 0,2 \text{ min}^{-1}$), što znači da će supstrat reagirati praktički svaki put kada se veže za ribozim. Stoga korak koji ograničava brzinu reakcije u uvjetima nepotpune zasićenosti supstratom je vezanje supstrata (Herschlag i Cech 1990b). U uvjetima zasićenosti ribozima supstratom, ograničavajući korak se događa nakon kemijskog. To je zaključeno iz činjenice da su konstante brzine za nestajanje supstrata u jednom obrtu katalize bile mnogo veće od k_{cat} (Herschlag i Cech 1990b). *Pulse-chase* pokusom dobivene vrijednosti konstante brzine disocijacije produkta (oligonukleotida koji je sparen s IGS slijedom introna) su se pokazale jednakima vrijednosti k_{cat} ($\approx 0,1 \text{ min}^{-1}$) (Herschlag i Cech 1990b). To je, dakle, korak koji ograničava brzinu reakcije pri uvjetima zasićenosti ribozima supstratom. Spora disocijacija produkta prve reakcije ima bitnu ulogu u samoizrezivanju s obzirom da ona, kao što je već ranije naglašeno, onemogućava preranu disocijaciju 5' eksona.

Dokazano je i da je vezanje G i supstrata na ribozim neovisno i nasumično. Bilo koji se može prvi vezati za ribozim, a vezanje jednog ne pogoduje ni na koji način vezanje onog drugog. Nema kooperativnosti niti strukturne nužnosti za vezanjem određenim redoslijedom (Herschlag i Cech 1990b). Vezanje oligonukleotidnog supstrata za vezno mjesto za 5' ekson je bilo 10^4 puta jače nego što je bilo očekivano ($K_d = 2 \text{ nM}$), što dokazuje da u vezanju, osim Watson-Crickovih interakcija, sudjeluju i dodatne tercijarne interakcije (Herschlag i Cech 1990b).

Dobivene konstante asocijacije supstrata, odnosno produkata i ribozima su bile u redu veličine $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, što je mnogo manje od granice difuzije malih molekula ($10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). I za proteinske enzime je ova konstanta niža od granice difuzije ($10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) zbog otežane dostupnosti veznog mjesta za supstrat (Herschlag i Cech 1990b). Kod RNA katalizatora su izmjerene konstante asocijacije supstrata vrlo bliske vrijednostima za stvaranje zavojnice između dva oligonukleotida. Te su vrijednosti niže od difuzijske konstante za male molekule jer mnogi sudari oligonukleotida ne rezultiraju stvaranjem zavojnice zbog čestog

neuspješne nukleacije koja je potrebna za inicijaciju formiranja uzvojnice (Herschlag i Cech 1990b).

Efikasnost ribozima se ne može vrednovati prema kriteriju da K_m mora biti veći od koncentracije supstrata *in vivo* zbog toga što veći ina nema obrtaj. Prema kriterijima Alberyja i Knowlesa (1976), pak, se može reći i da je analizirani ribozim (IVS iz *Tetrahymena*) dostigao evolucijsko (katalitičko) savršenstvo zato što u uvjetima nepotpune zasićenosti ribozima vezanje supstrata je faktor koji ograničava brzinu reakcije, odnosno difuzijski korak ograničava brzinu, a ubrzavanjem kemijskog koraka se ne može više povećati brzinu cjelokupne reakcije (Herschlag i Cech 1990b). k_{cat}/K_m vrijednost se približava granicnim vrijednostima proteinskih katalizatora, što govori o visokoj katalitičkoj efikasnosti ovih molekula.

5. Zaključci

Biološki katalizatori su osnova kemije života. Ubrzavaju i termodinamski povoljne, ali kinetički nepovoljne reakcije (s visokim energijama aktivacije) u stanici, oni omogućavaju odvijanje života. Do pred 30 godina su se u ovu skupinu ubrajali samo proteinski enzimi, ali danas tu spadaju i katalitičke molekule RNA (ribozimi) koje koriste katalitičke mehanizme poznate iz primjera proteinskih enzima, ali prilagođene njihovoj drugoj strukturi i funkcionalnim skupinama (što rezultira drugom sposobnošću stvaranja interakcija), te svojom fleksibilnosti i gustošću nabojâ. U svijetu ribozima su najčešće katalizatori metalnim ionima i kiselinsko-bazna kataliza, a ima podataka i o upotrebi vezne energije u katalizi. Rjeđe se nailazi na primjer upotrebe elektrostatske katalize, a ima i vrlo zanimljivih primjera katalize potpomognute supstratom ili malom organskom molekulom kao kofaktorom. Ovakva raznolikost mehanizama je bila potpuno neekvivalentna od molekule kojoj na prvi pogled nedostaju mnogi preduvjeti da bi bila dobar katalizator.

Ostaje činjenica da RNA u današnje doba katalizira izrazito uzak spektar reakcija; najčešće se radi o prijenosu fosforila, te u slučaju ribosoma o prijenosu peptidila. Vrlo je intrigantno pitanje zašto se RNA održala kao katalizator uopće, s pojavom proteinskih enzima, te zbog čega u današnje doba katalizira baš ove reakcije. Moguće je da je to zato što svojstva RNA čine ovu molekulu posebno pogodnom za katalizu metalnim ionima, koja je pak optimalno rješenje za ubrzanje spomenutih reakcija. Za sve druge reakcije u živom svijetu su se proteinski enzimi pokazali pogodnijima, te su darvinovskom selekcijom na molekularnoj razini istisnuli RNA katalizatore.

Proteini danas drže primat u savršenstvu katalize, postignutim ubrzanjima i raznovrsnosti kataliziranih reakcija. Ipak, ribozimi i dalje kataliziraju nekoliko za život centralnih reakcija poput sinteze proteina, a neke druge reakcije kataliziraju efikasnošću u koja može konkurirati katalizi proteinskim enzimima (npr. izrezivanje introna). Današnji ribozimi su živi fosili koji podsjećaju na zlatno doba ove fascinantne i svestrane molekule u najranijim poslijecima života na Zemlji.

6. Literatura

1. Alberts, B.; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter *Molecular biology of the cell*; Garland Science: New York, 2008.
2. Bevilacqua, P. C.; Yajima, R. Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Current opinion in chemical biology* **2006**, *10*, 455–464.
3. Cech, Thomas R Ribozyme mechanisms and folding. *Biochemical Society Transactions* **2002**, *30*, 1162–1166.
4. DeRose, V. J. Two decades of RNA catalysis. *Chemistry & biology* **2002**, *9*, 961–969.
5. Doherty, E. A.; Doudna, J. A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2001**, *30*, 457–475.
6. Doudna, J. A.; Cech, T. R. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **2002**, *418*, 222–228.
7. Doudna, J. A.; Lorsch, J. R. Ribozyme catalysis: not different, just worse. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, *12*, 395–402.
8. Forterre, P. The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie* **2005**, *87*, 793–803.
9. Garriga, G.; Lambowitz, A. M.; Inoue, T.; Cech, T. R. Mechanism of recognition of the 5' splice site in self-splicing group I introns. , *Published online: 03 July 1986; / doi:10.1038/322086a0* **1986**, *322*, 86–89.
10. Herschlag, D.; Cech, T. R. Catalysis of RNA cleavage by the Tetrahymena thermophila ribozyme. 1. Kinetic description of the reaction of an RNA substrate complementary to the active site. *Biochemistry* **1990b**, *29*, 10159–10171.
11. Herschlag, D.; Cech, T. R. DNA cleavage catalysed by the ribozyme from Tetrahymena. *Nature* **1990a**, *344*, 405–409.
12. Holzmann, J.; Frank, P.; Löffler, E.; Bennett, K. L.; Gerner, C.; Rossmann, W. RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell* **2008**, *135*, 462–474.
13. Kelly Kruger; Paula J Grabowski; Arthur J Zaug; Julie Sands; Daniel E Gottschling; Thomas R Cech Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, *31*, 147–157.

14. Lilley, D. M. J. The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends in biochemical sciences* **2003**, 28, 495–501.
 15. Martha J Fedor Ribozymes. *Current Biology* **1998**, 8, R441–R443.
 16. Mary R Stahley; Scott A Strobel RNA splicing: group I intron crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, 16, 319–326.
 17. McClain, W. H.; Lai, L. B.; Gopalan, V. Trials, travails and triumphs: an account of RNA catalysis in RNase P. *Journal of molecular biology* **2010**, 397, 627–646.
 18. Narlikar, G. J.; Herschlag, D. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annual review of biochemistry* **1997**, 66, 19–59.
 19. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry & eBook*; Fifth ed.; W. H. Freeman, 2008.
 20. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science* **2000**, 289, 920–930.
 21. Piccirilli, J. A.; Vyle, J. S.; Caruthers, M. H.; Cech, T. R. Metal ion catalysis in the Tetrahymena ribozyme reaction. *Nature* **1993**, 361, 85–88.
 22. Ramakrishnan, V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* **2002**, 108, 557–572.
 23. Reiter, N. J.; Osterman, A.; Torres-Larios, A.; Swinger, K. K.; Pan, T.; Mondragón, A. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature* **2010**, 468, 784–789.
 24. Stahley, M. R.; Adams, P. L.; Wang, J.; Strobel, S. A. Structural metals in the group I intron: a ribozyme with a multiple metal ion core. *Journal of molecular biology* **2007**, 372, 89–102.
 25. Strobel, S. A.; Cochrane, J. C. RNA Catalysis: Ribozymes, Ribosomes and Riboswitches. *Current opinion in chemical biology* **2007**, 11, 636–643.
 26. Tsai, C. S. *Biomacromolecules: introduction to structure, function, and informatics*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2006.
 27. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2011.
- www.nobelprize.org

7. Sažetak

Kataliti ke RNA se ubrajaju u skupinu bioloških katalizatora, u koju spadaju i mnogo rašireniji, efikasniji i mla i proteinski enzimi. Okosnica molekule RNA je gusto negativno nabijena s vrlo fleksibilnim vezama, a funkcionalne skupine za katalizu su malobrojne i monotone. Ipak, RNA katalizira nekoliko centralnih stani nih reakcija koriste i najviše katalizu metalnim ionima i kiselinsko-baznu katalizu, ali i doprinos vezne energije, elektrostatsku katalizu, kovalentnu, te ponekad ak i organske kofaktore i sam supstrat kao pomo u katalizi.

Mali ribozimi (*hammerhead*, *hairpin* i HDV) cijepaju sami sebe koriste i kao nukleofil 2'-OH riboze na ijem se 3' kraju nalazi veza koja podliježe cijepanju. Veliki ribozimi (introni grupe I i II) koriste hidroksilnu skupinu riboze udaljenog ili vanjskog nukleotida kao nukleofil, a sudjeluju u procesu izrezivanja introna iz pre-RNA i ligaciji eksona. U stanici postoji i nekoliko ribonukleoproteinskih kompleksa gdje RNA ima kataliti ku ulogu, me u kojima je najbitniji ribosom. injenica da RNA može sadržavati geneti ki zapis i omogu avati njegov kontinuitet, s jedne strane, te katalizirati kemijske reakcije, s druge, ide u prilog hipotezi o RNA-svijetu prema kojoj je ova molekula, u po ecima života na Zemlji, objedinila rani metabolizam i prijenos informacije.

8. Summary

Catalytic RNAs are biological catalysts, a group of molecules which also comprises a much bigger number of younger and more effective catalysts – the enzymes. The RNA backbone is highly negatively charged with very flexible bonds, and the functional groups are few and monotonous. However, RNA catalyzes a few biochemical reactions that are of central importance for cells, using mostly metal ion catalysis and acid-base catalysis, as well as the contribution of binding energy, electrostatic and covalent catalysis, and even sometimes using organic cofactors and the substrate itself as a contributing factor in catalysis.

Small ribozymes (the *hammerhead*, *hairpin* and HDV) are self-cleaving; they activate the 2'-OH group of the ribose adjacent to the scissile phosphate for nucleophilic attack. In large ribozymes (group I and II introns) the nucleophile is the -OH group of the ribose of a distant or even exogenous nucleotide; they catalyze intron splicing. There are also a few ribonucleoprotein complexes in the cell in which RNA is the catalytical entity. The most important is the ribosome. The fact that RNA is a molecule that can contain genetic information and allow genetic continuity, on one hand, and can catalyze chemical reactions, on the other, is supportive of the hypothesis of an RNA world in which, during the beginnings of life on Earth, RNA combined early metabolism and information transfer.